Tierärztliche Hochschule Hannover

Institut für Virologie

Analyse der zytoplasmatischen Domäne eines *Alphacoronavirus* Spike-Proteins und ihrer Funktion beim Zusammenbau von Viruspartikeln

THESE

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

vorgelegt von

Sandra Gelhaus (geb. Siewert)

aus Lemgo

Hannover 2014

Supervisorin: Dr. Christel Schwegmann-Weßels

Betreuungsgruppe: Dr. Christel Schwegmann-Weßels
Prof. Dr. Hassan Y. Naim
Prof. Dr. Thomas Pietschmann

1. Gutachten: Dr. Christel Schwegmann-Weßels
Institut für Virologie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Hassan Y. Naim
Institut für Physiologische Chemie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Prof. Dr. Thomas Pietschmann
Experimentelle Virologie
TWINCORE, Hannover

2. Gutachten: Prof. Dr. Andrea Maisner
Institut für Virologie
Philipss Universität Marburg

Datum der Disputation: 22.04.2014

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Emmy Noether-Programms der DFG, Projekt SCHW 1408/1-1 gefördert.



Thorsten

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

a	Adenin
aa	Aminosäuren (*amino acids*)
Abk.	Abkürzung
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (*Angiotensin-Converting-Enzyme 2*)
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APN	Aminopeptidase N
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (*Aqua bidestillata*)
AS	Aminosäure oder *Antisense*-Primer
BAC	*Bacterial artificial chromosome*
bp	Basenpaare
BCoV	Bovines Coronavirus
BHK	*Baby hamster kidney*
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Cytosin
cDNA	*complementary* DNA
CEACAM1	*Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1*
CoV	Coronavirus
CPE	zytopathischer Effekt
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Carbocyanin-3
DAPI	4’,6-Diamidin-2’-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	*Escherichia coli*
ED	*Ektodomäne*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EMEM	Eagle´s Minimum Essential Medium
E-Protein	Envelope-Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-intermediäres Kompartiment (*Endoplasmic reticulum golgi intermediate compartment*)
et al.	und andere (*et alli*)
FcoV	Felines Coronavirus
FIPV	*Feline infectious peritonitis virus*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm (bezogen auf die Masse) oder Erdbeschleunigung oder Guanin
HCoV	Humanes Coronavirus
HEK	*human embryonic kidney*
HE-Protein	Hämagglutinin-Esterase-Protein
IBV	Infektiöses Bronchitisvirus (*Infectious bronchitis virus*)
ICTV	*International Committee for the Taxonomy of Viruses*
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
mAK	monoklonaler Antikörper
MCS	*Multiple Cloning Site*
MERS	*Middle East Respiratory Syndrome*
MHV	Maus-Hepatitisvirus (*Murine hepatitis virus*)
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
M-Protein	Membranprotein
mRNA	*messenger* RNA
MW	Mediumwechsel
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
N-Terminus	Aminoterminus
NZ	Nitrozellulose
ORF	Offener Leserahmen (*open reading frame*)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
pAPN	porzine Aminopeptidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSM	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*)
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
POD	Peroxidase
pp	Polyprotein
PRCoV	Porzines Respiratotisches Coronavirus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
S	*Sense*-Primer
SARS	schweres akutes Atemwegssyndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
sg mRNAs	subgenomische RNAs
S-Protein	Spike-Protein
(+)ss-RNA	Positiv-orientierte Einzelstrang-RNA
ST	*swine testis*
t	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*

TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
TGEV	Virus der übertragbaren Gastroenteris der Schweine (*Transmissible gastroenteritis virus*)
TMD	Transmembrandomäne
U	Einheit (*Unit*)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VLPs	Virusähnliche Partikel (*Virus-like particles*)
v/v	Volumen zu Volumen
WB	Westernblotanalyse
well	Vertiefung
wt	Wildtyp
w/v	Masse zu Volumen
X	beliebige Aminosäure
ZD	Zytoplasmatische Domäne
α	entgegengerichtet (bei Antikörpern)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
θ	hydrophobe Aminosäure

Aminosäuren		
Alanin	A	**Ala**
Arginin	R	**Arg**
Asparagin	N	**Asn**
Asparaginsäure	D	**Asp**
Cystein	C	**Cys**
Glutamin	Q	**Gln**
Glutaminsäure	E	**Glu**
Glycin	G	**Gly**
Histidin	H	**His**
Isoleucin	I	**Ile**
Leucin	L	**Leu**
Lysin	K	**Lys**
Methionin	M	**Met**
Phenylalanin	F	**Phe**
Prolin	P	**Pro**
Serin	S	**Ser**
Threonin	T	**Thr**
Tryptophan	W	**Trp**
Tyrosin	Y	**Tyr**
Valin	V	**Val**

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abstract

Analysis of the cytoplasmic domain of an *Alphacoronavirus* Spike protein and its function during virus assembly

Sandra Gelhaus

Coronaviruses (CoV) are a family of enveloped, single-stranded, positive-sense RNA viruses. The transmissible gastroenteritis virus (TGEV), an *Alphacoronavirus* that represents an enteropathogenic CoV of swine is the subject of this work. Three different glycoproteins, the spike (S), the membrane (M) and the envelope (E) protein are incorporated into the envelope of TGE virions. The CoV S protein is required for attachment to the cellular receptor and for subsequent membrane fusion with the host cell membrane. The incorporation of S is achieved by its interaction with the viral M protein during assembly. A conserved cysteine-rich motif (CRM) and a tyrosin-based retention signal are located in the cytoplasmic domain of the TGEV S protein, which leads to the retention of S at the CoV budding site the ERGIC (endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment). Cysteine-rich regions in a membrane proximal area present a potential site for palmitoylation. Previous studies on other CoVs have already shown that palmitoylation can be crucial for infectivity, S-M protein interaction, cell-cell fusion and S incorporation into virus particles. This work aims to study the role of the S protein CRM during TGE virion assembly and the role of the CRM and the tyrosin-based retention signal in S-M protein interaction. To map the crucial cysteine residues in the S protein, various cysteine residue substitutions were introduced within the CRM. A virus-like particle (VLP) assay was performed to investigate the incorporation ability of these cysteine-mutants. It has been observed that the complete substitution of all ten cysteine-residues in the CRM prevented the incorporation of S into VLPs. However, partial cysteine-mutants were still able to incorporate into VLPs. Above all, it made no difference which cysteines were substituted. We further demonstrated by metabolic labeling with ^{3}H-palmitic acid that in contrast to the partial cysteine mutants the complete cysteine mutant of S is palmitoylation-deficient. However, the S-M protein interaction was not impaired with the non-palmitoylated S mutant. Furthermore, it was shown by confocal microscopy that mutations affecting the intracellular retention of the S had no influence on the S-M protein interaction. Taken together, these results demonstrate that the palmitoylation of S is essential for S incorporation into TGE virions and that the requirements for S incorporation differ from those for S-M protein interaction during TGEV assembly.

Keywords: TGEV, S protein, virus assembly, palmitoylation, tyrosin-based retention signal

Zusammenfassung

Analyse der zytoplasmatischen Domäne eines *Alphacoronavirus* Spike-Proteins und ihrer Funktion beim Zusammenbau von Viruspartikeln

Sandra Gelhaus

Coronaviren (CoV) sind behüllte Viren mit einem positiv-orientierten RNA-Genom. Das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV) ist ein Vertreter der *Alphacoronaviren*. Innerhalb der Hülle von TGEV liegen drei Glykoproteine vor, das Spike (S)-, das Membran (M)- und das Envelope (E)-Protein. Das S-Protein ist verantwortlich für die Bindung an den zellulären Rezeptor und die anschließende Fusion von viraler und zellulärer Membran während des Viruseintritts. Der Einbau des S-Proteins in Viruspartikel erfolgt durch die Interaktion mit dem M-Protein. Innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des TGEV S-Proteins befinden sich ein cysteinreiches Motiv (CRM) und ein tyrosinbasiertes Retentionssignal, das für die Retention am Ort des Viruszusammenbaus (Endoplasmatische Retikulum-Golgi-intermediäre Kompartiment, ERGIC) sorgt. CRMs in membrannahen Proteinsequenzen werden oft post-translational palmitoyliert. Studien an anderen Coronaviren konnten bereits zeigen, dass die Palmitoylierung des S-Proteins wichtig sein kann für die CoV-Infektiösität, die Zell-Zell-Fusion, die S-M-Proteininteraktion oder beim Einbau des S-Proteins in Viruspartikel. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des CRM des TGEV S-Proteins während des Zusammenbaus von TGEV-Partikeln und die Rolle des CRM und des tyrosinbasierten Retentionssignals bei der S-M-Proteininteraktion untersucht. Um essentielle Cysteine innerhalb des CRM, zu identifizieren wurden verschiedene Cys-Mutanten kloniert. Mit Hilfe von VLP(Virusähnliche-Partikel)-Assays konnte gezeigt werden, dass eine volle Cys-Mutante nicht in VLPs eingebaut wird, partielle Cys-Mutanten hingegen schon. Die Lage der Cysteine spielte dabei keine Rolle. Durch metabolische Markierung mit ^{3}H-Palmitinsäure konnte gezeigt werden, dass die volle Cys-Mutante palmitoylierungsdefizient ist, die partiellen Mutanten allerdings acyliert werden. Die S-M-Proteininteraktion war bei der palmitoylierungsdefizienten Mutante jedoch nicht beeinträchtigt, wie in Koexpressions-Studien in Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden konnte. Des Weiteren konnte durch Konfokalmikroskopie gezeigt werden, dass Mutationen innerhalb des S-Proteins, die eine Retention des Proteins verhindern, ebenfalls keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem M-Protein hatten. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Palmitoylierung des S-Proteins wichtig ist für dessen Einbau in Viruspartikel und dass der S-M-Proteininteraktion und dem S-Proteineinbau beim Zusammenbau von TGE-Viruspartikeln unterschiedliche Bedingungen zu Grunde liegen.

Schlagworte: TGEV, S-Protein, Viruszusammenbau, Palmitoylierung, Retentionssignal

1. Einleitung

1.1 Coronaviren

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der *Coronaviridae* bildet zusammen mit den Familien *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* und den *Roniviridae* die Ordnung der *Nidovirales* (Abb. 1-1). Der Ordnungsname Nidovirales leitet sich vom lateinischen Wort *nidus* (Nest) ab und bezieht sich auf die Eigenschaft während des Virusreplikationszyklus geschachtelte *messenger*-RNAs (mRNAs) zu bilden.

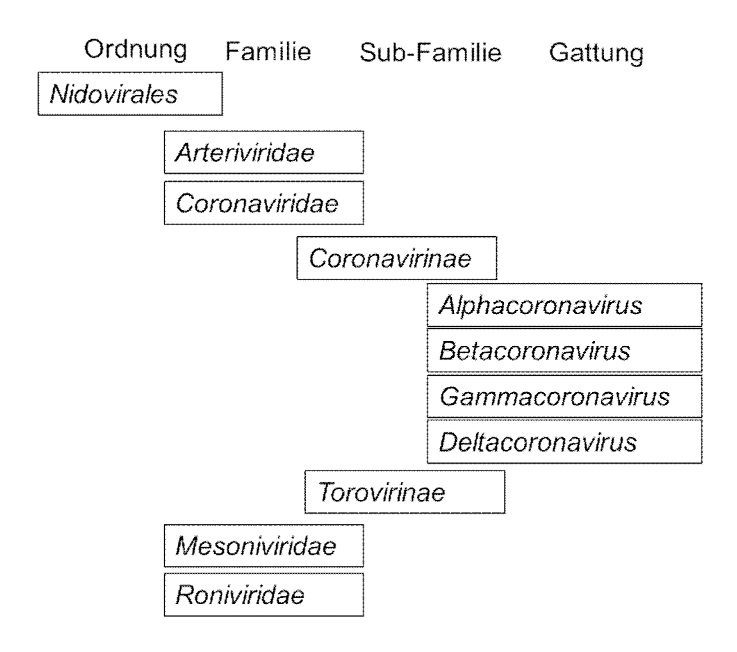


Abb. 1-1 Taxonomische Einteilung der Ordnung Nidovirales.
(Datenquelle: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2014)

Die Familie *Coronaviridae* wird in zwei Sub-Familien die *Coronavirinae* und die *Torovirinae* unterteilt. Bis 2009 erfolgte die Einteilung der *Coronavirinae* in drei Hauptgruppen (I, II und III). Diese Einteilung wurde jedoch abgelöst und durch die Gattungen *Alpha*-, *Beta*- und *Gammacoronavirus* ersetzt. Die SARS (Schweres akutes respiratorisches Syndrom)-CoV-Epidemie im Jahr 2003 führte zu einem drastischen Anstieg der Anzahl an neuentdeckten Coronaviren (CoV). Aufgrund von neuen bioinformatischen Analysen dieser Virusgenome ist es zu einem Aufsplittern der Gattung

Gammacoronaviren gekommen. Der Sub-Familie der *Coronavirinae* wurde die vierte Gattung *Deltacoronavirus* zu geordnet (Woo et al., 2010).

Viren der Gattungen *Alphacoronavirus* und *Betacoronavirus* infizieren ausschließlich mammalische Spezies. Bekannte Vertreter der Alphacoronaviren sind u.a. das feline infektiöse Peritonitisvirus (FIPV), das humanpathogene Coronavirus-229E (HCoV-229E) und das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV, engl. *Transmissible gastroenteritis virus*), das in dieser Arbeit untersucht wurde. Innerhalb der Gattung *Betacoronavirus* lassen sich u.a. die humanpathogenen Erreger des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS-CoV) und des *Middle-East* respiratorischen Syndroms (MERS-CoV) finden. Außerdem ist der Prototyp der Coronaviren, das Maus Hepatitisvirus (MHV) ein Vertreter dieser Gattung. Gammacoronaviren besitzen ausschließlich aviäre Wirte. Ein wichtiger Vertreter unter den aviär-pathogenen Coronaviren ist das Virus der infektiösen Bronchitis (IBV). In die Gattung *Deltacoronavirus* werden Viren aufgrund ihrer Sequenzhomologie gruppiert, die aviäre und mammalische Spezies infizieren. Vertreter dieser Gattung sind u.a. das Drossel-CoV (ThCoV-HKU12) und das Beluga-Wal-CoV (BWCoV) (Abb. 1-2).

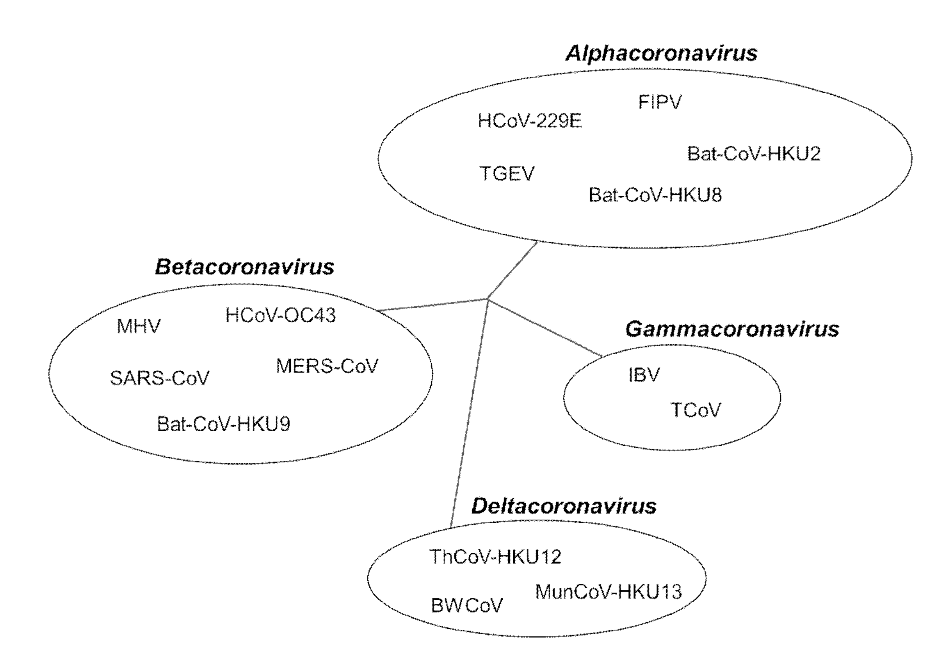


Abb. 1-2 Vertreter der Gattungen der Coronavirinae
(Datenquelle: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2014). Bat-CoV (Fledermaus CoV), BWCoV (Beluga-Wal Coronavirus), FIPV (Felines infektiöses Peritonitisvirus), HCoV (Humanes Coronavirus), IBV (Infektiöses Bronchitisvirus), MHV (Maus Hepatitisvirus), MERS-CoV (*Middle-East* respiratorisches Syndrom Coronavirus), MunCoV-HKU13 (Munia Coronavirus), TCoV (Truthahn, engl. *Turkey* Coronavirus), TGEV (Virus der übertragbaren Gastroenteritis, engl. *Transmissible gastroenteritis virus*), ThCoV-HKU12 (Drossel, engl. *Trush* Coronavirus), SARS-CoV (Schweres akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus).

1.1.2 Coronaviren als Krankheitserreger

Coronaviren haben ein breites Wirtsspektrum. Sie infizieren mammalische und aviäre Spezies. Außerdem besitzen sie einen breiten Zelltropismus. Coronaviren können Zellen des Respirations-, Gastrointenialtrakts und Zellen des Nervensystems infizieren.

Vor der SARS-Epidemie, im Jahr 2003, waren bislang zwei humanpathogene Coronaviren bekannt, das HCoV-OC43 und das HCoV-229E. HCoV-229E wurde in den 1960er Jahren erstmals als bedeutsamer Erreger von Erkältungskrankeiten beim Menschen beschrieben (Tyrrell und Bynoe, 1965; Almeida und Tyrrell 1967). Die humanen Coronaviren wurden als eher harmlose Atemwegserkrankungen (Heikkinen und Järvinen, 2003) angesehen, bis 2003 ein unbekanntes Coronavirus (SARS-CoV) jedoch als Ursache der schweren Atemwegsinfektion SARS (schweres akutes respiratorisches Syndrom) identifiziert wurde und zu einer Epidemie führte (Drosten et al., 2003; Ksiazek et al., 2003; Peiris et al., 2003). Durch epidemiologische Analysen konnte der Ursprung des Erregers ermittelt werden. Ein Arzt, der auf einem „*Wet market*“ (spezielle Märkte in Asien, auf denen lebende Tiere und rohes Fleisch zum Verkauf angeboten werden) Patienten behandelte, infizierte sich dort mit dem SARS-Erreger und verbreitete das Coronavirus durch vielfache Personenkontakte (Riley et al., 2003). Genetische Analysen von Virusisolaten aus infizierten Schleichkatzen und infizierten Menschen zeigten, dass sich das Virus an den humanen Wirt adaptiert hatte (Song et al., 2005). Es konnten Mutationen innerhalb der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) des viralen Spike-Proteins nachgewiesen werden, die zur Bindung des Virus an einen humanen Rezeptor führten (Li et al., 2005).

Als primäres Reservoir der Coronaviren konnte die Fledermausart Chinesische Hufeisennase (*Rhinolophus* spp.) identifiziert werden (Lau et al., 2005). Molekulare Studien identifizierten seit der SARS-Epidemie mindestens 70 weitere neue Coronaviren in Fledermäusen in Europa (Gloza-Rausch et al., 2008), in Amerika (Dominguez et al., 2007), in Afrika (Tong et al., 2009) und in Asien (Woo et al., 2007).

Das Übertreten der Speziesbarriere ist vermutlich kein Phänomen, was ausschließlich bei SARS-CoV eingetreten ist. Der Vergleich von Genomsequenzen zeigt, dass sich z.B. BCoV (Bovines Coronavirus) und HCoV-OC43 genetisch sehr ähnlich sind, und es wahrscheinlich vor ca. 100 Jahren zu einer Übertragung des bovinen Virus auf den Menschen gekommen ist (Vijgen et al., 2005). Ein Vergleich der Gruppen-spezifischen Gene weist auch darauf hin, dass TGEV vermutlich durch ein Übertreten der Speziesbarriere von mit CCoV (canines Coronavirus) infizierten Hunden auf Schweine evolviert ist (Lorusso et al., 2008). Knapp zehn Jahre nach der SARS-Epidemie wurde ein zweites humanpathogenes Coronavirus bei Patienten in Saudi-Arabien entdeckt, dass ebenfalls wie SARS-CoV zu schweren und tödlichen Krankheitsverläufen führte (Zaki et al., 2012). Dieses Virus, *Middle East respiratory syndrome* (MERS)-CoV repräsentierte einen neuen Vertreter der Gattung *Betacoronavirus.* Auch hier zeigten Genomanalysen, dass MERS-CoV eine enge genomische Verwandschaft mit Fledermaus-CoVs besitzt (van Bohemeen et al., 2012; Perlman et al., 2013).

Obwohl SARS-CoV das erste humane Coronavirus war, das schwere und tödliche Krankheitsverläufe beim Menschen zeigte, waren zuvor bereits tierpathogene Coronaviren bekannt, die zu schweren lebensbedrohlichen Krankheiten führen. Dazu zählen u.a. das Virus der übertragbaren Gastroenteritis der Schweine (TGEV, *Transmissible gastroenteritis virus*), das feline infektiöse Peritonitisvirus (FIPV), das infektiöse Bronchitisvirus (IBV), das bovine Coronavirus (BCoV) und das Maushepatitisvirus (MHV).

Die Krankheitsbilder die für Coronavirusinfektionen typisch sind, waren schon lange vor der ersten Isolation eines Coronavirus bekannt. Das Krankheitsbild, das für TGEV charakteristisch ist, wurde erstmals 1935 beschrieben (Smith, 1956). Im Jahr 1946 konnten Doyle and Hutching ein Coronavirus als Erreger der Gastroenteritis bei Schweinen identifizieren (Doyle und Hutching, 1946). TGEV ist ein porzines Coronavirus, das eine Gastroenteritis bei Schweinen hervorruft, die hoch ansteckend ist und durch eine hohe Mortalität (oft 100%) bei Ferkeln charakterisiert ist (Saif et al., 2012). Die Eintrittsroute für TGEV ist die Mundhöhle. Im Dünndarm infiziert es die Epithelzellen auf den Zottenspitzen. Das virale Spike Protein bindet an die Aminopeptidase N, den zellulären Rezeptor von TGEV, der in der intestinalen Bürstensaummembran

exprimiert wird (Delmas et al., 1992). Die TGEV-Infektion führt zu einer schwerwiegenden Nekrose der Enterozyten und resultiert in einer Zottenatrophie. Dadurch wird die Enzymtätigkeit des Dünndarms gestört und es kommt zu einer Störung der Verdauung und des zellulären Transports von Nährstoffen und Elektrolyten. Dies führt zu einer massiven Dehydrierung und einem akuten Brechdurchfall bei den infizierten Schweinen (Saif et al., 2012). Durch die Industrialisierung der Schweinehaltung gewann TGEV an ökonomischer Bedeutung, da infizierte Tierbestände zu wirtschaftlichen Einbußen führten. Das Auftreten von TGEV-Ausbrüchen ist seit Ende der 1980er Jahre rückläufig (Enjuanes und Van Zeist, 1995). Es treten jedoch noch vereinzelt TGEV Infektionen in Britannien, den USA und Asien auf (Kim et al., 2000; Chae et al., 2000; Pritchard et al., 1999). Die Ausbreitung einer natürlich vorkommenden Variante von TGEV, PRCoV (Porzines Respiratorisches Coronavirus), wird als Grund für die Regression der TGEV-Ausbrüche angesehen (Callebaut et al., 1988; Pensaert et al., 1986). PRCoV weist u.a. Deletionen innerhalb des Spike-Proteins auf (Rasschaert et al., 1990). Die TGEV-Variante repliziert im Gegensatz zu TGEV effizient im Respirationstrakt jedoch nicht im Gastrointestinaltrakt und zeigt ein milderes Krankheitsbild als TGEV (Cox et al., 1990). PRCoV und TGEV besitzen eine nahe serologische Verwandtschaft und PRCoV infizierte Tiere erwerben eine natürliche Immunität gegen TGEV (Callebaut et al., 1988).

Das Maushepatitisvirus (MHV) ist ein Vertreter der Gattung *Betacoronavirus*. Im Jahr 1949 konnten Cheever und Kollegen erstmals einen MHV-Stamm isolieren (Cheever et al., 1949). MHV ist der bis dato am besten untersuchte Vertreter aller Coronaviren. Viele Mauskolonien in der Forschung sind mit MHV infiziert. Diese Infektionen stellen ein großes Problem innerhalb der biomedizinischen Forschung dar (Pritchett-Corning et al., 2009). Es gibt eine Vielzahl an MHV-Stämmen, die sich in Virulenz, Pathogenese und Organtropismus unterscheiden. Je nach Virusstamm und Infektionsweg kann MHV Entzündungen der Leber, Infektionen innerhalb des zentralen Nervensystems, des Respirations- und Gastrointestinaltrakts verursachen. MHV-Infektionen werden genutzt, um als Modell für die Untersuchung von bestimmten Krankheitsmechanismen zu dienen. Es werden z.B. virusinduzierte Hepatiden oder Multiple Sklerose anhand von MHV-Infektionen untersucht (Elliott und Weiss, 2013; Wu et al., 2010; Phillips et al., 1999).

1.1.3 Aufbau von Coronaviruspartikeln

Coronaviren (CoV) sind behüllte Viren und besitzen ein einzelsträngiges RNA-Genom. Das virale Genom ist mit dem N-Protein assoziiert und bildet zusammen mit diesem Protein das Nukleokapsid, welches von der Virushülle umgeben ist. Die Virushülle ist eine Lipiddoppelschicht und mit ihr sind die viralen Strukturproteine Spike (S)-, Membran (M)- und Envelope (E)-Protein assoziiert (Abb. 1-3).

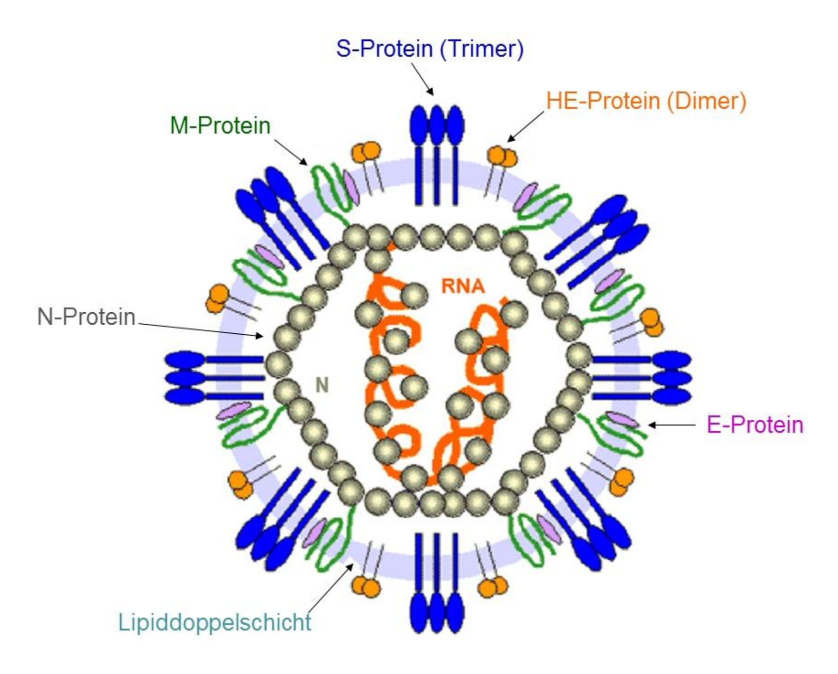


Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Aufbaus eines Coronaviruspartikels.
(Vabret et al., 2009; entnommen und modifiziert). E (Envelope)-Protein, HE (Hämagglutinin-Esterase)-Protein, M (Membran)-Protein, N (Nukleokapsid)-Protein, S (Spike)-Protein.

Bei einigen Vertretern der Betacoronaviren befindet sich ebenfalls das (Hämagglutinin-Esterase (HE)-Protein in der Virushülle. Das HE-Protein ist beim Viruseintritt und Virusaustritt involviert, wird jedoch nicht während der Virusreplikation benötigt (Lissenberg et al., 2005).

1.1.3.1 Genomorganisation

Coronaviren besitzen ein einzelsträngiges, positiv-orientiertes RNA-Molekül ((+)ss-RNA) mit einer Größe von 26-32 kb (Abb. 1-4). Dieses RNA-Molekül besitzt ein methyliertes Guanosin-Cap am 5´-Ende und eine Poly-Adenosin (A)-Sequenz am 3´-Ende. Das Genom der Coronaviren ist das Größte unter den bekannten RNA-Viren.

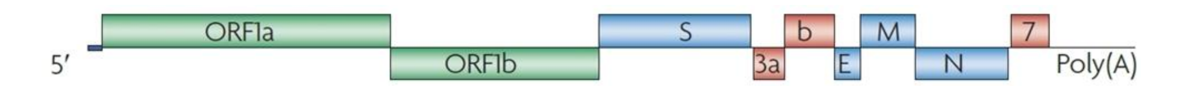


Abb. 1-4 Genomorganisation von TGEV.
Das Genom kodiert für ORF1a und 1b und die Strukturproteine (blau) und akzessorischen Proteine (rot). (Perlman und Netland, 2009; entnommen und modifiziert).

Das RNA-Molekül der Coronaviren enthält je nach Gattung sechs bis zehn offene Leseraster (ORFs, *open-reading frames*). Die ersten beiden offenen Leseraster 1a und 1b stellen ca. zwei Drittel des Genoms dar und kodieren für Nicht-Strukturproteine (nsp), die für die virale Replikation benötigt werden. Das übrige Drittel des Genoms kodiert für die viralen Strukturproteine und die akzessorischen Proteine (Abb. 1-4). Die Strukturproteingene sind in jedem CoV-Genom in einer festen Reihenfolge, (HE)-S-E-M-N, angeordnet. Die akzessorischen Proteine sind nicht essentiell für die Virusreplikation in Zellkultursystemen (Ontiveros et al., 2001; Yount et al., 2005). Bekannt ist jedoch, dass einige der Nichtstrukturproteine (nsp1, nsp3) und akzessorischen Proteine (ORF6, ORF3b) die Induktion von Interferon (IFN) während einer CoV-Infektion unterdrücken (Kopecky-Bromberg et al., 2006; Wathelet et al., 2007) und zur Degradierung der wirtseigenen mRNAs und somit zur Inhibierung der Wirtszelltranslation führen (Kamitani et al., 2006).

1.1.3.2 Spike (S)-Protein

Das Spike (S)-Protein der Coronaviren ist ein Strukturprotein und befindet sich in der Hülle von Viruspartikeln (Abb. 1-3). S-Proteinmonomere werden im ER zu Trimeren zusammengebaut und werden während des Viruszusammenbaus im ERGIC in die Viruspartikel integriert (Opstelten et al., 1993; Delmas und Laude, 1990; Tooze et al.,

1984). Die S-Proteintrimere sind verantwortlich für die keulenförmigen Projektionen auf der Oberfläche von Viruspartikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 1-5). Dieses charakteristische, kronenförmige Erscheinungsbild ist der Anlass für die Namensgebung der Coronaviren (lat. *Corona*: Krone) (Almeida et al., 1968).

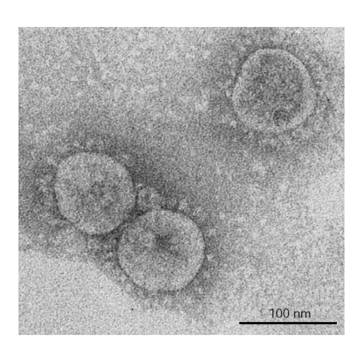


Abb. 1-5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Coronaviruspartikeln. (Stadler et al., 2004)

Das S-Protein vermittelt durch die Bindung an den zellulären Rezeptor den Zelltropismus und ist verantwortlich für die Fusion von Virus- und Zellmembran beim Viruseintritt und gegebenenfalls (speziesabhängig) für die Fusion von Zell- und Zellmembran, was zur Ausbildung von Synzytien führt. Die S-Proteine variieren bei den unterschiedlichen Coronavirenspezies in ihrer Größe. Das kürzeste S-Protein mit 1160 Aminosäuren (AS) besitzt IBV. Das FIPV S-Protein wird hingegen mit einer Anzahl von 1452 AS synthetisiert (Cavanagh, 1995). Das S-Protein von TGEV (Stamm: PUR46-MAD) weist eine Anzahl von 1447 AS auf (Sánchez et al., 1992).

Coronavirale S-Proteine sind Typ 1 Membranproteine. Sie besitzen eine relativ große N-terminale Ektodomäne (ED), eine Transmembrandomäne (TMD) und eine zytoplasmatische Endodomäne (ZD) am C-Terminus (Abb. 1-6). Die Ektodomänen der S-Proteine sind charakterisiert durch einen hohen Grad an Glykosylierung, wobei die angehängten Glykane dabei N-glykosyliert sind (Cavanagh, 1995; Stern und Sefton, 1982; Rottier et al., 1981).

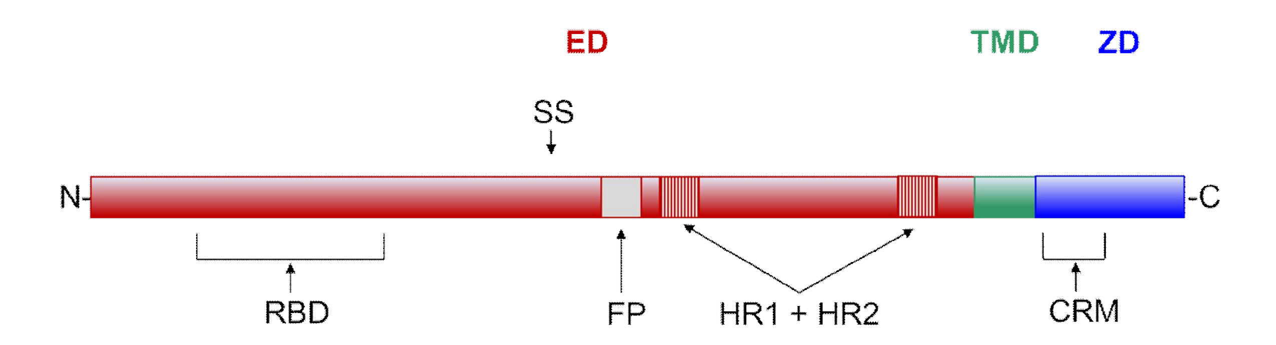


Abb. 1-6 Schematische Darstellung des Spike (S)-Proteins.
ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmatische Domäne, RBD: Rezeptorbindungsdomäne, FP: Fusionspeptid, HR: Heptad-repeat Region, CRM: Cysteinreiches Motiv, SS: Spaltstelle.

Innerhalb der Ektodomäne (Abb. 1-6) der corononviralen S-Proteine befindet sich die Rezeptorbindungsdomäne (RBD). Außerdem befinden sich in der Ektodomäne ein Fusionspeptid (FP) und die Heptad-Repeat Sequenzen HR1 und HR2, die eine wichtige Rolle bei der Fusion viraler und zellulärer Membran beim Viruseintritt einnehmen (s.a. Kapitel 1.1.4.1). Bei einigen S-Proteinen befindet sich in der Ektodomäne eine potentielle proteolytische Spaltstelle (SS). Durch die proteolytische Spaltung innerhalb multi-basischer Sequenzen wird die RBD-tragende N-terminale S_1-Einheit von der fusionsfähigen C-terminalen S_2-Einheit separiert. Diese Spaltung ist für einige Virusstämme von z.B. IBV und MHV, jedoch nicht für TGEV beschrieben (Yamada und Liu, 2009; De Haan et al., 2004; Garwes und Pocock, 1975). Bei allen coronaviralen S-Proteinen lässt sich im membrannahen Abschnitt der Endodomäne ein cysteinreiches Motiv (CRM) finden (Abb. 1-7).

```
                TMD                            ZD
TGEV-PUR-46     KWPWYVWLLIGLVVIFCIPLLLFCCCSTGCCGCIGCLGSCCHSICSRRQFENYEPIEKVHVH
SARS-CoV        KWPWYVWLGFIAGLIAIVMVTILLCCMTSCCSCLKGACSCGSCCKFDEDDSEPVLKGVKLHYT
MHV-A59         KWPWYVWLLIGLAGVAVCVLLFFICCCTGCGSCCFKKCGNCCDEYGGHQDSIVIHNISSHED
HCoV-OC43       KWPWYVWLLICLAGVAMLVLLFFICCCTGCGTSCFKKCGGCCDDYTGYQELVIKTSHDD
HCoV-HKU1       KWPWYVWLLISFSFIIFLVLLFFICCCTGCGSACFSKCHNCCDEYGGHHDFVIKTSHDD
FIPV 79-1146    KWPWYVWLLIGLVVVFCIPLLLFCCFSTGCCGCIGCLGSCCHSICSRRQFENYEPIEKVHVH
IBV Beaudette   KWPWYVWLAIAFATIIFILILGWVFFMTGCCGCCCGCFGIMPLMSKCGKKSSYYTTFDNDVVTEQYRPKKSV
```

Abb. 1-7 Sequenz-Alignment von coronaviralen S-Proteinen.
Dargestellt sind die Transmembrandomänen (TMD) und die zytoplasmatischen Domänen (ZD) von S-Proteinsequenzen unterschiedlicher Coronavirenspezies. Die unterstrichenen Cysteine stellen potentielle Palmitylierungsstellen in der membrannahen Proteinsequenz dar.

Es besteht wenig Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Spezies innerhalb der CRM, aber der Cysteingehalt in dieser Region macht bei allen S-Proteinen ca. 35 % aus. Membrannahe Cysteinreste innerhalb eines zytoplasmatischen Proteinabschnitts sind potentielle Aminosäurebereiche für die post-translationale Modifikation mit Palmitinsäuren. Für das SARS-CoV und das MHV S-Protein konnte gezeigt werden, dass diese Region palmitoyliert wird (Petit et al., 2007; Thorp et al., 2006).

Ebenfalls lässt sich in der Endodomäne (Abb. 1-7) des TGEV S-Proteins ein tyrosinbasiertes Retentionssignal (1440YEPI1443) finden. Dieses Signal sorgt für die intrazelluläre Lokalisation des S-Proteins am ERGIC (Endoplasmatische Retikulum Golgi-intermediäre Kompartiment), dem Ort des Viruszusammenbaus von Coronaviren (Paul et al., 2014; Schwegmann-Weßels et al., 2004).

1.1.3.3 Membran (M)-Protein

Das Membran (M)-Protein der Coronaviren ist ebenfalls, wie das S-Protein ein Strukturprotein, das sich in der Virushülle befindet (Abb. 1-3).

Das primäre Translationsprodukt des M-Proteins variiert bei den unterschiedlichen Coronaviren. Das TGEV M-Protein besitzt eine Länge von 262 Aminosäuren. Das M-Protein ist ein Typ III-Membranprotein. Die M-Proteine weisen am N-Terminus ein Signalpeptid auf, das für die intrazelluläre Lokalisation im Golgi-Apparat sorgt (Klumperman et al., 1994; Krijnse-Locker et al., 1995; Rottier et al., 1987). Dort akkumuliert das M-Protein zu homomultimeren Komplexen (Krijnse-Locker et al., 1992). Die homotypischen Interaktionen der M-Proteine werden durch multiple Bindungsstellen innerhalb der Transmembrandomänen aufrechterhalten (de Haan et al., 2000). Das TGEV M-Protein weist drei bis vier Transmembrandomänen auf (Escors et al., 2001a). Das TGEV M-Protein wird in zwei unterschiedlichen Topologien in die Virushülle eingelagert. Bei der Nexo-Cendo Topologie befinden sich der N-Terminus auf der Virusoberfläche und der C-Terminus innerhalb des viralen Partikels. Bei der Nexo-Cexo Topologie befinden sich beide Termini auf der Virusoberfläche (Escors et al., 2001a; Risco et al., 1995).

Die M-Proteine der Coronaviren spielen bei dem Zusammenbau von Coronaviruspartikeln eine wichtige Rolle (s.a. Kapitel 1.1.4.3), denn es konnte gezeigt werden, dass das M-Protein mit beinahe allen anderen Strukturproteinen (S-, E- und N-Protein) Interaktionen eingeht (Lim und Liu, 2001; Lanser und Howard, 1980; Sturman et al., 1980; Narayanan et al., 2000; Opstelten et al., 1995). Dabei spielt die Glykosylierung des M-Proteins keine Rolle beim Viruszusammenbau (De Haan et al., 1998) oder bei der Interaktion mit dem S-Protein (De Haan et al., 1999).

1.1.3.4 Envelope (E)-Protein

Das Envelope (E)-Protein ist ein kleines integrales Membranprotein, das in die Hüllmembran der Coronaviren eingelagert ist (Abb. 1-3). Es weist bei den unterschiedlichen Coronavirusspezies eine Länge von 76 bis 109 Aminosäuren auf. Das E-Protein weist ein bis zwei prognostizierte Transmembrandomänen auf. In Studien konnte gezeigt werden, dass das E-Protein sowohl eine Transmembran- als auch eine Hairpin-Struktur innerhalb der Virushülle aufweist (Yuan et al., 2006; Maeda et al., 2000). Die E-Proteine der Coronaviren werden in einem prä-Golgi-Kompartiment beobachtet, in dem sie sich vorübergehend ansammeln (Lim und Liu, 2001), bevor sie weiter in den Golgi-Komplex transportiert werden (Corse und Machamer, 2000; Corse und Machamer et al., 2002; Cohen et al., 2011).

Das E-Protein übernimmt Aufgaben beim Viruszusammenbau, der Knospung und der Virusmorphogenese. Ist das E-Protein während der Virusreifung von TGEV abwesend kommt es zu einer Ansammlung der Viruspartikel innerhalb des sekretorischen Transportweges und die Viren werden nicht entlassen (Ortego et al., 2007). Bei MHV und SARS-CoV scheint jedoch die Anwesenheit des E-Proteins nicht essentiell für die Bildung und Freisetzung von Viren zu sein. Die rekombinanten Viren, bei denen das E-Gen fehlt, zeigen jedoch eine attenuierte Infektiösität und eine anormale Morphologie der Viruspartikel im Vergleich zu rekombinanten Viren mit Wildtypgenom (Kuo und Masters, 2003; DeDiego et al., 2007; Fischer et al., 1998). Die E-Proteine von Coronaviren bilden Oliogomere aus und zeigen Ionenkanalaktivität (Torres et al., 2006; Madan et al., 2005; Wilson et al., 2004), was sehr wahr-

scheinlich eine wichtige Bedeutung während des Transports der Viruspartikel entlang des sekretorischen Transportwegs hat (s.a. Kapitel 1.1.4.3).

Während des Viruszusammenbaus interagiert das E-Protein mit dem M-Protein. Diese Interaktion erfolgt über die zytoplasmatische Domäne und über die Transmembrandomäne des E-Proteins (Lim und Liu, 2001; Chen et al., 2009). Es wird angenommen, dass das E-Protein während der Virusknospung die Aufgaben der Membraneinstülpung und der Membranabschnürung übernimmt. Denn in Einzelexpressionsstudien des MHV E-Proteins konnte gezeigt werden, dass das E-Protein in prä-Golgi-Kompartimenten akkumuliert und dort fähig ist Einstülpungen der Membran einzuleiten (Raamsman et al., 2000).

Innerhalb der zytoplasmatischen Domänen der CoV E-Proteine liegen, wie auch bei den CoV S-Proteinen, in der membrannahen Sequenz konservierte Cysteine vor. Diese Cysteine werden bei dem MHV (Boscarino et al., 2008; Lopez et al., 2008), SARS-CoV (Liao et al., 2005) und dem IBV (Corse und Machamer, 2002) E-Protein post-translational durch das Anknüpfen von Palmitinsäuren modifiziert. Man konnte beobachten, dass die Palmitoylierung des MHV E-Proteins sowohl für den Viruszusammenbau, als auch für die Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln essentiell ist (Boscarino et al., 2008; Lopez et al., 2008).

1.1.4 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Coronaviren kann in die funktionellen Abschnitte Viruseintritt, Genomreplikation und Translation sowie Viruszusammenbau und Virusfreisetzung gegliedert werden (Abb. 1-8) und wird im Folgenden beschrieben.

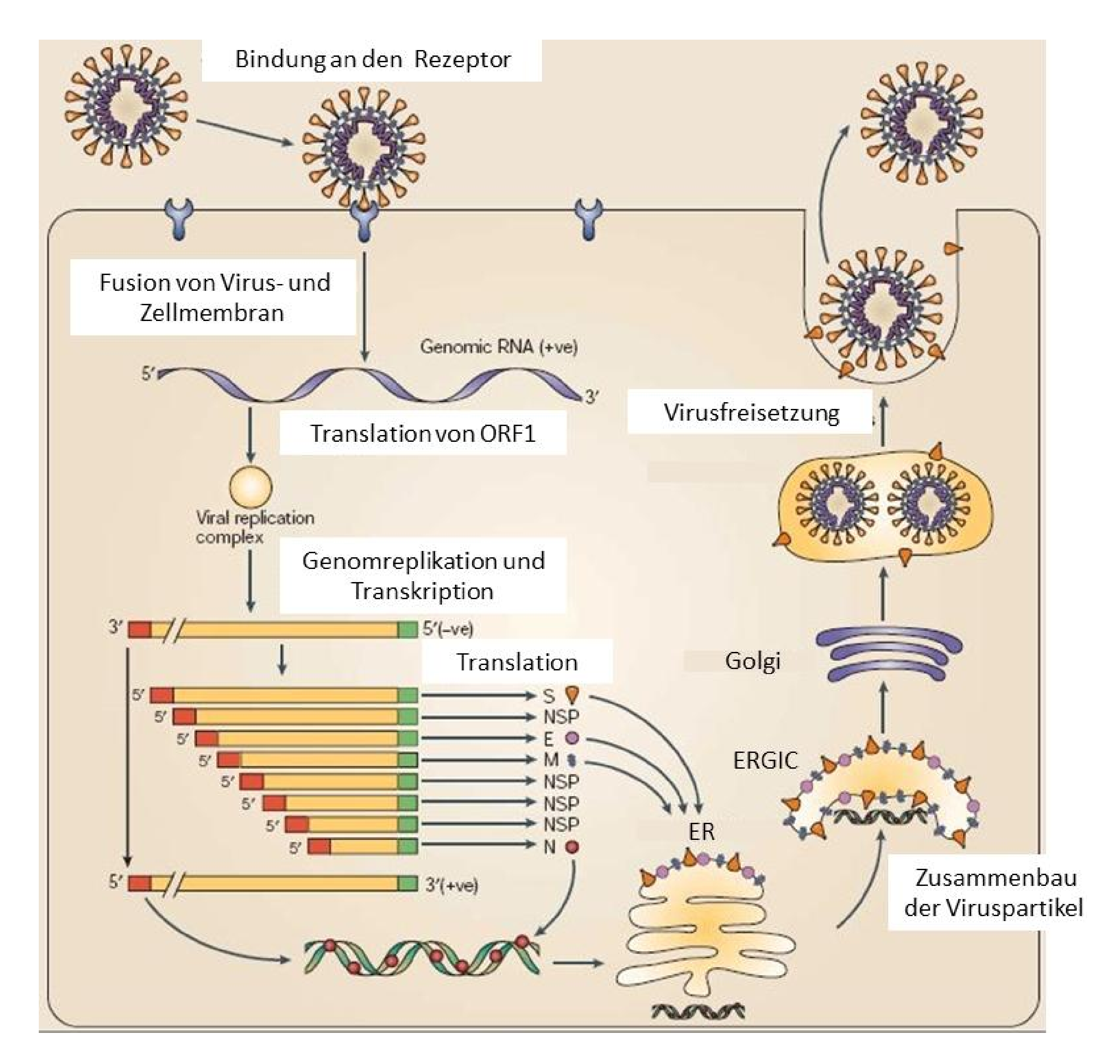


Abb. 1-8 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Coronaviren
(Stadler et al., 2004). ER (Endoplasmatische Retikulum), ERGIC (ER-Golgi intermediäres Kompartiment), Golgi (Golgi-Apparat), ORF (Offener Leseraster, engl. open reading frame), NSP (Nicht-Strukturproteine), S, E, M, N (Strukturproteine).

1.1.4.1 Viruseintritt

Bindung an den zellulären Rezeptor

Der CoV-Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des S-Proteins an den zellulären Rezeptor der Wirtszelle. Einige Rezeptoren der unterschiedlichen Coronaviren sind bis heute identifiziert. MHV bindet an das Adhäsionsmolekül CEACAM1 (*Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule* 1) um eine Wirtszelle zu infizieren (Dveksler et al., 1991; Hemmila et al., 2004). Vertreter der Alphacoronaviren (HCoV-229E, FIPV, FCoV, CCoV) wie auch TGEV, nutzen die Aminopeptidase N (APN) als zellulären Rezeptor (Delmas et al., 1992). APN, auch bekannt als CD13, wird auf der apikalen Seite von Epithelzellen im Respirations- und Verdauungstrakt exprimiert. Das SARS-CoV gelangt in seine Wirtszellen durch die Interaktion des S-Proteins mit dem Angiotensin-konvertierenden Enzym, ACE 2 (Li et al., 2003). ACE 2 ist ein Membranprotein und wird u.a. im Lungengewebe exprimiert. Der Rezeptor von MERS-CoV ist Dipeptidyl-Peptidase 4 (Raj et al., 2013).

Fusion von Virus- und Zellmembran

Nach der anfänglichen Bindung an den zellulären Rezeptor ist es bei behüllten Viren für eine erfolgreiche Infektion notwendig, dass sie ihre Virusmembran mit der Zellmembran fusionieren und das virale Nukleokapsid in die Wirtszelle entlassen, um ihr Genom zu replizieren. Für TGEV konnten Hansen und Kollegen 1989 zeigen, dass es einer Rezeptor-vermittelten Endozytose und einer Ansäuerung innerhalb der endozytierten Vesikel bedarf, um eine erfolgreiche Fusion zu erzielen (Hansen et al., 1998).

Eine allgemeine Hypothese ist, dass behüllte Viren, wie z.B. HIV (Humans Immundefiziens-Virus), Influenzaviren, Ebolaviren und HRSV (Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus) einen ähnlichen Membranfusions-Mechanismus entwickelt haben (Chan et al., 1997; Bullough et al., 1994; Weissenhorn et al., 1998; Zhao et al., 2000). Die Fusion der viralen mit der zellulären Membran (Abb. 1-9) wird bei behüllten Viren durch Konformationsänderungen der S-Proteine bestimmt (Bosch et al., 2003). Die Bindung an den Rezeptor stellt einen Trigger für diese essentielle Konformationsänderungen des S-Proteins während der Fusion dar (Matsuyama und

Taguchi, 2009; Krueger et al., 2001; Zelus et al., 2003). Zwei hoch konservierte *Heptad-Repeat*-Regionen HR1 und HR2 (Abb. 1-6) innerhalb der S-Proteine fungieren als wichtige Domänen während der Fusion beim Viruseintritt. Die nach der Rezeptorbindung erfolgende Konformationsänderung der coronaviralen S-Proteine bewirkt, dass eine hydrophobe Sequenz N-terminal von HR1 zur zellulären Membran gerichtet wird und als Fusionspeptid (FP) agiert (Luo und Weiss, 1998; Madu et al., 2009). Das S-Protein verbindet so die zelluläre mit der viralen Membran und formt das intermediäre Fusionsprodukt aus (Abb. 1-9). HR1 und HR2 bestehen je aus drei parallelen Helices. Durch die Interaktion von HR1 und HR2 kommt es zum Ausbilden der antiparallelen *coiled-coil*-Struktur, dem sogenannten sechs-Helix-*Bundle* und damit zur Bildung des Virusfusionskerns (Zhao et al., 2000). Diese Struktur konnte durch Kristallstrukturanalysen bei MHV und SARS-CoV (Xu et al., 2004a; 2004b; 2004c) und für TGEV (Ma et al., 2005) identifiziert werden. Durch das Ausbilden des sechs-Helix-*Bundle* werden das Fusionspeptid und die TMD zusammengeführt und die virale und die zelluläre Membran in eine räumliche Nähe gebracht (Bosch et al., 2003; Bullough et al., 1994; Weissenhorn et al., 1998).

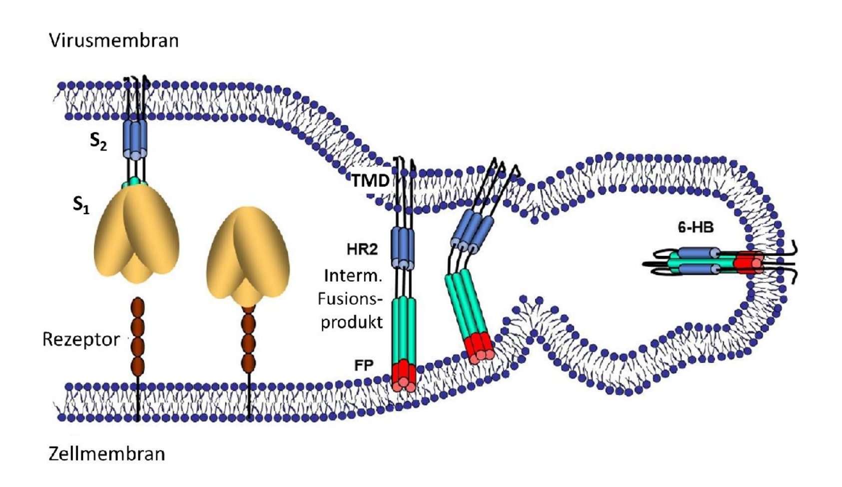


Abb. 1-9 Schematische Darstellung der S-Protein-vermittelten Membranfusion am Beispiel des MHV S-Proteins.
(Heald-Sargant und Gallagher, 2012; entnommen und modifiziert). FP (Fusionspeptid), HR1 und HR2 (*Heptad-Repeat*-Regionen 1 und 2), S_1 und S_2 (S-Proteinuntereinheiten), TMD (Transmembrandomäne), 6-HB (sechs-Helix-*Bundle*)

Um eine erfolgreiche Membranfusion zu erfüllen, bedarf es zusätzlich einer tryptophanreichen Region am äußersten C-Terminus der Ektodomäne (Broer et al., 2006; Lu et al., 2008) und einer palmitoylierten Region am Übergang der Transmem-

brandomäne und des zytoplasmatischen Abschnitts des S-Proteins (Bos et al., 1995; Petit et al., 2007; Shulla und Gallagher, 2009).

1.1.4.2 Genomreplikation und Translation der viralen Proteine

Translation von ORF1a und ORF1b

Ist das virale Genom (Abb. 1-4) in die Wirtszelle entlassen, findet die Translation des 5´-Endes der viralen RNA statt (Abb. 1-8). Dort befinden sich der erste offene Leseraster (ORF1), der für die Polypeptide (pp) 1a und 1ab codiert. Diese Polypeptide entstehen durch eine ribosomale Leserasterverschiebung. Innerhalb des pp1a sind funktionale Proteinasen (Papain-like (PL) und Poliovirus 3C-like (3CL)-Proteinasen) codiert, die für die Spaltung der beiden Polyproteine in Nicht-Strukturproteine (nsp) sorgen (Perlman und Netland, 2009; Brian und Baric, 2005).

Genomreplikation und Transkription

Die durch ORF1a und 1b codierten nsp formen die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase und bilden die Replikations- und Transkriptions- Maschinerie aus. Die Synthese der (–)ss-RNA wird eingeleitet, die als Template für neue virale Genome dient (Sawicki und Sawicki, 2005). Genomreplikation und Transkription finden in Doppelmembran-Vesikeln (engl. *double-membrane Vesicles*; DMVs) innerhalb des Zytoplasmas statt (Snijder et al., 2006). Die DMVs sind nicht isoliert im Zytoplasma, sondern sind in netzartigen Strukturen aus modifizierter ER-Membran eingebettet (Knoops et al., 2008). Das N-Protein kolokalisiert kurz nach der Infektion mit dem Replikations-Komplex in den DMVs (Bost et al., 2001). Die neu synthetisierte virale RNA gelangt von den DMVs an den Ort des Viruszusammenbaus, wo sie mit der Virushülle interagieren und neue genomhaltige Viruspartikel formen (Bost et al., 2001).

Die Transkription in der Ordnung *Nidovirales* ist eine RNA-abhängige RNA-Synthese, die diskontinuierlich verläuft und zur Synthese von subgenomischen (sg) mRNAs führt (Sawicki und Sawicki, 1998). Es entsteht eine Ansammlung von geschachtelten sg mRNAs. Diese sg mRNAs dienen als Templates für die Translation von viralen Struktur- und Nicht-Strukturproteinen. Es gibt zwei Modelle, die die Transkription bei Coronaviren beschreiben. In dem ersten Modell wird postuliert, dass die sg mRNAs

aus der diskontinuierlichen Transkription des volle Länge (–)ss-RNA-Molekül entstehen (während der Positivstrangsynthese) (Sethna et al., 1989). In dem zweiten Modell wird die Hypothese dargelegt, dass (–)ss-RNA-Templates für die sg mRNAs direkt von der genomischen RNA diskontinuierlich transkribiert werden (während der Negativstrangsynthese) (Sawicki und Sawicki, 1998). In der Abb. 1-8 ist die Synthese der sg mRNAs während der Positivstrangsynthese dargestellt.

Translation

Zelluläre mRNAs besitzen eine 5´-Cap-Struktur und eine 3´-Poly-A-Sequenz. Diese Strukturen rekrutieren die ribosomalen Untereinheiten und führen durch ihre Interaktion zu einer Steigerung der Translationseffizienz (Sachs et al., 1997). Die gebildeten viralen sg mRNAs besitzen ebenfalls diese mRNA-Modifikationen. Dadurch sind die viralen mRNAs in der Lage, die zelluläre Translationsmaschinerie zu nutzen. Dabei wird jedoch nur der 5´-Terminale ORF einer jeden sg mRNA translatiert. Die Infektion von Coronaviren führt zu einer Inhibition der Translation von wirtszelleigenen Proteinen (Banerjee et al., 2000; Tahara et al., 1994). Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Translationsrate von viralen Proteinen (Banerjee et al., 2002; Kyuwa et al., 1994).

1.1.4.3 Viruspartikelzusammenbau und -freisetzung

Viruspartikelzusammenbau

Der Viruszusammenbau und die Virusknospung von Coronaviren findet nicht wie bei vielen anderen behüllten Viren, wie z.B. Orthomyxoviren, Rhabdoviren oder Retroviren an der Plasmamembran, sondern an intrazellulären Membranen des ER-Golgi intermediären Kompartiments (ERGIC) statt (Krijnse-Locker et al., 1994; Tooze et al., 1984). Der Vorgang des Viruszusammenbaus kann in drei Abschnitte unterteilt werden. In den Zusammenbau des Nukleokapsid, der Hüllmembran und abschließend in die Zusammenführung des Nukleokapsids und der Hüllmembran, was zur Bildung der genomhaltigen Viruspartikel führt.

Eine wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Zusammenbau von Viruspartikeln ist die Lokalisation der einzelnen Strukturproteine am Ort der Knospung (ERGIC).

Dabei nehmen Signalsequenzen innerhalb der viralen Proteine und laterale Proteininteraktionen eine große Bedeutung ein. Die MHV, IBV und TGEV M- und E-Proteine werden im Golgi-Kompartiment lokalisiert (Klumperman et al., 1994; Krijnse-Locker et al., 1992; Corse und Machamer, 2000; Cohen und Machamer, 2011). Das TGEV S-Protein wird durch ein tyrosinhaltiges Retentionssignal im ERGIC zurückgehalten (Schwegmann-Weßels et al., 2004; Paul et al., 2014). Das SARS-CoV S-Protein wird hingegen auf der Plasmamembran exprimiert, wird jedoch in Koexpression mit dem SARS-CoV M-Protein intrazellulär zurückgehalten (Mc Bride et al., 2007).

Der Viruszusammenbau wird vermittelt durch Interaktionen der M, S-, E- und N-Proteine. Vor allem dem M-Protein werden vorherrschende Funktionen bei den lateralen Proteininteraktionen während des Viruszusammenbaus zugesprochen. Das M-Protein weist die Fähigkeit auf mit nahezu allen anderen viralen Strukturproteinen zu interagieren. Die Interaktionen des M-Proteins mit dem E-Protein (Lim und Liu, 2001) und dem N-Protein (Sturman et al., 1980; Narayanan et al., 2000) sind experimentell belegt. Das M-Protein interagiert mit dem E-Protein über die jeweiligen zytoplasmatischen Domänen der Proteine miteinander, wie für das IBV M-Protein gezeigt werden konnte (Corse und Machamer, 2003). Heterotypische Interaktionen zwischen dem S- und dem M-Protein konnten durch Koimmunpräzipitationen und Sedimentationsanalysen gezeigt werden (Opstelten et al., 1995).

Coronaviren sind in der Lage ihre Virushüllen Nukleokapsid-unabhängig zu konstruieren und diese abzuschnüren. Durch diesen Vorgang können virusähnliche Partikel (VLPs, engl. *virus-like particles*) enstehen. Dazu ist lediglich die Expression des M- und des E-Proteins notwendig. Dies konnte für MHV (Vennema et al., 1996), IBV (Corse et al., 2000), TGEV und BCoV (Baudoux et al., 1998) beobachtet werden. Die Daten für die Bedingungen für den Zusammenbau von SARS-Coronavirushüllen sind hingegen nicht so eindeutig. Es gibt Studien, die belegen, dass ebenfalls die Koexpression von M- und E-Protein ausreichend sind für die Bildung von VLPs (Huang et al., 2004), jedoch auch Studien die zeigen, dass das M- und N-Protein (Hsieh et al., 2005), oder sogar nur das M-Protein in Einzelexpression (Tseng et al., 2010) ausreichend sind. Mutationen innerhalb der carboxy-terminalen Endodomäne des M-Proteins führten zu einer ineffizienten bzw. unterbleibenden Bildung von VLPs (Arndt et al., 2010).

Der Zusammenbau der Virushülle ist nicht abhängig vom S-Protein. Ist das S-Protein während des Zusammenbaus präsent, wird es jedoch durch die Interaktion mit dem M-Protein in die VLPs eingebaut (Vennema et al., 1996; Nguyen und Hogue, 1997; Opstelten et al., 1995). Es entstehen VLPs, die in Morphologie und Größe nicht von authentischen Virionen unterschieden werden können (Vennema et al., 1996). Das E-Protein scheint neben dem M-Protein ebenfalls eine wichtige Schlüsselrolle während des Zusammenbaus von Coronavirus-Partikel und im Replikationszyklus der Viren auszuüben. Das E-Protein ist vermutlich mitverantwortlich für das Einstülpen (Knospung) der Membran und das Abschnüren der Viruspartikel (siehe auch Kapitel 1.1.3.4).

Ein weiterer Schritt, neben der Entstehung der Virushülle, ist die Bildung des Nukleokapsids. Die Verpackung des relativ großen RNA-Genoms von ~30kb in Viruspartikel mit einer Sphäre von <100nm bedarf einer extrem gut-verpackten, helikalen und super-*coiled* RNA (Chang et al., 2014). Das N-Protein bindet dabei mit multiplen Regionen an die RNA und verpackt sie in einen aufwendig gefalteten Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex (Takeda et al., 2008; Hilser und Thompson, 2007; Chang et al., 2009). Ein weiterer Bereich des N-Proteins vermittelt hingegen die Interaktion mit dem viralen M-Protein (He et al., 2004). In Untersuchungen mit TGE-Viruspartikeln konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus des M-Proteins mit dem Nukleokapsid verbunden ist (Escors et al., 2001b). Es wird ein Model postuliert, bei dem die C-Termini der M-Proteine, die ins Viruspartikelinnere zeigen, mit den N-Proteintermini interagieren, die aus dem RNP-Komplex herausragen und so die Verbindung zwischen Virushülle und Nukleokapsid vermitteln (Chang et al., 2014).

Virusfreisetzung

Coronaviren benutzen den sekretorischen Transportweg einer Wirtszelle für die Virusfreisetzung. Die im ERGIC durch Knospung entstanden Viruspartikel durchwandern in Vesikeln den sekretorischen Transportweg, über den Golgi-Apparat, bis zur Plasmamembran. Studien haben gezeigt, dass das E-Protein essentiell ist für die Virusvermehrung (Curtis et al., 2002; Ortego et al., 2002). Eine nähere Betrachtung zeigt, dass E-Protein-Deletionsmutanten von CoVs einen Zusammenbau von Viruspartikeln ermöglichen, es jedoch zu einer Anhäufung dieser Partikel innerhalb des sekretorischen Transportwegs kommt (Ortego et al., 2007; DeDiego et al., 2007).

Das E-Protein schließt sich zu homomeren Pentameren zusammen und kann damit einen Ionenkanal bilden (Wilson et al., 2004; Pervushin et al., 2009). Durch Einzelexpressionsstudien mit dem E-Protein konnte eine Alternierung des sekretorischen Transportwegs beobachtet werden (Ruch und Machamer, 2011). Dies lässt die Vermutung zu, dass u.a. das E-Protein mit seiner Ionenkanalaktivität die treibende Kraft für das Umordnen der Golgi-Apparatmembranen ist und dafür sorgt, dass die CoV-Partikel ordnungsgemäß den sekretorischen Transportweg entlang wandern können und es zu einer Virusfreisetzung an der Plasmamembran kommt. Die Ektodomänen der viralen Strukturproteine erfahren durch den Transport im sekretorischen Transportweg noch unterschiedliche Reifungsprozesse, wie z.B. Glykosylierung (Salanueva et al., 1999; Stern und Sefton, 1982). Schließlich fusionieren die Transportvesikel mit der Zytoplasmamembran und es kommt zur Virusfreisetzung (Vennema et al., 1996).

1.2 Palmitoylierung

Palmitoylierung (oder S-Acylierung) ist die post-translationale Modifikation von Proteinen, bei der eine gesättigte langkettige Fettsäure (meist Palmitinsäure) an Cysteine reversibel über eine Thioesterverbindung (Abb. 1-10) verknüpft wird (Schmidt et al., 1988; Veit et al., 1991).

Abb. 1-10 Verknüpfung einer gesättigten, langkettigen Fettsäure an die Aminosäure Cystein, über eine Thioesterverbindung, innerhalb eines Proteins.

Proteinpalmitoylierung wurde zuerst in den 1970er Jahren bei viralen Proteinen entdeckt (Schmidt und Schlesinger, 1980). Bis heute wurden jedoch in jedem eukaryotischen Organismus palmitoylierte Proteine nachgewiesen (Bijlmakers und Marsh,

2003). Aktuelle Studien zeigen, dass die Anzahl an S-acylierten Proteinen je nach Organismus variieren. So sind in Hefen rund 50 (Roth et al., 2006) palmitoylierte Proteine nachgewiesen worden in Säugetieren dagegen mehrere Hundert (Martin und Cravatt, 2009; Yang et al., 2010).

Der freie ungebundene Palmitoyl-CoA (Coenzym A) Ester dient in der Zelle als Lipiddonor und kommt in nanomolaren Konzentrationen in Zellen vor (Berger und Schmidt, 1984a; Faergemann et al., 1997). Eine Familie von DHHC (Asp-His-His-Cys)-Motiv-haltigen Proteinen konnte als Palmitoylacyltransferasen (PAT) in Hefen und mammalischen Zellen identifiziert werden (Hou et al., 2009; Blaskovic et al., 2013). Palmitoylierungsaktivitäten sind entlang der Membranen des sekretorischen Transportwegs (ER bis Golgi-Apparat), in endozytotischen Vesikeln oder auf der Plasmamembran zu finden (Ohno et al., 2006). Die DHHC-Proteine zeigen keine typische Enzym-Substrat-Spezifität, denn durch Proteinsequenzvergleiche von palmitoylierten Proteinen konnte keine Konsensussequenz ermittelt werden. Die meisten Cysteine, die palmitoyliert werden, befinden sich in der Proteinsequenz nahe der Transmembrandomäne (TMD), max. 20 Aminosäuren davon entfernt (Yang und Compans, 1996; Yik und Weigel, 2002). Diese Cysteine haben in ihrer Nachbarschaft oft hydrophobe und basische Aminosäuren. Die Palmitoylierung kann sowohl Carboxy- als auch Amino-terminal auftreten. Für zelluläre Proteine ist auch eine Palmitoylierung an intermolekularen Sequenzen beschrieben (Gundersen et al., 1994; Cools et al., 2001). Auch Cysteine, die sich innerhalb der TMD-Sequenz befinden, können palmitoyliert werden, wie für das Masernvirus Fusions (F) -Protein gezeigt werden konnte (Caballero et al., 1998). Im Gegensatz zu anderen Lipidmodifikationen von Proteinen ist die Palmitoylierung reversibel. Dies geschieht durch sogenannte zytosolische Acylproteinthioesterasen (APT) im sekretorischen Transportweg (Dekker et al., 2010; Duncan und Gilmann, 1998). Die Palmitoylierung und De-Palmitoylierung von Proteinen vermittelt eine Möglichkeit der Proteinregulation.

1.2.1 Mechanismen der Palmitoylierung

Unterschiedliche Mechanismen liegen den durch Palmitoylierung bestimmten Proteinfunktionen zugrunde und werden im Folgenden anhand von Beispielen erläutert.

Eine Konsequenz der Palmitoylierung ist die Konformationsänderung der Transmembrandomäne (TMD) der palmitoylierten Proteine. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Palmitoylierung von Membranproteinen nicht ausschließlich dazu beiträgt eine zusätzliche Verbindung mit der Membran einzugehen, sondern vielmehr, dass die angelagerten Fettsäuren zu einer Neigung der ursprünglich senkrecht zur Membran verlaufenden TMD führen können (Joseph und Nagaraj, 1995). Dieser Mechanismus spielt z.B. eine Rolle während des Proteintransports entlang des sekretorischen Transportweges. Die ER-Membran ist dünner als die Plasmamembran, vermutlich aufgrund des niedrigeren Cholesterolgehaltes und/oder der Proteinzusammensetzung innerhalb der Membranen (Mitra et al., 2003). Eine α-helikale TMD hat typischerweise 20-30 Aminosäuren (Bowie, 1997; Arkin und Brunger, 1998; Senes et al., 2000; Ulmschneider und Sansom, 2001). Hat die Membran, in der das Protein eingelagert ist, eine größere hydrophobe Dicke als die hydrophobe Länge der helikalen TMD, kommt es zu einem sogenannten hydrophobischen Versatz (*hydrophobic mismatch*) (Nyholm et al., 2007). Dieser Versatz der TMD kann zur Rekrutierung der ER-Qualitätskontrolle führen und das entsprechende Protein im ER retendieren. Es wird angenommen, dass palmitoylierte Cysteine in einer membrannahen Region die TMD in einem bestimmten Winkel neigen, um somit die effektive Länge der TMD zu reduzieren, um einen solchen hydrophobischen Versatz entgegen zu wirken (Abrami et al., 2008; Joseph und Nagaraj, 1995).

Lipid rafts sind Membrandomänen, die mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. Die Palmitoylierung vieler Membranproteine sorgt für eine Einlagerung der Proteine in solche *lipid rafts* (Levental et al., 2010; Charollais und van der Goot, 2009). Die Fähigkeit der verknüpften Palmitinsäuren, Proteine zu bestimmten Membrandomänen zu führen, ist nicht nur auf *lipid rafts* beschränkt. Palmitoylierte Proteine werden auch in spezielle ER-Domänen oder in die Nukleusmembran (Lynes et al., 2012; Lakkaraju et al., 2012) eingelagert.

Palmitoylierung von Membranproteinen kann auch für die Interaktion mit anderen löslichen Proteinen oder Membranproteinen verantwortlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass z.B. das ER-Chaperon Calnexin palmitoyliert ist und dadurch einen Super-Komplex mit dem ER-Translocon, dem Ribosom, und der Oligosaccharyltrans-

ferase eingeht. Durch diesen Super-Komplex ist das Chaperon fähig neusynthetisierte Proteine korrekt falten zu können (Lakkaraju et al., 2012).

Die Wechselwirkungen mit anderen post-translationalen Modifikationen spielt auch für die Palmitoylierung eine große Bedeutung. Die Ubiquitinylierung ist eine post-translationale Modifikation von Proteinen neben der Palmitoylierung, und spielt u.a. eine Rolle bei der Degradation von Proteinen (Hicke und Dunn, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass palmitoylierungsdefiziente Proteinmutanten in der Nähe der eigentlichen Palmitoylierungsstelle ubiquitinyliert werden und es dadurch zu einer Destabilisierung und vorzeitigen Degradation der Proteine kommt (Abrami et al., 2006; Percherancier et al., 2001; Blanpain et al., 2001).

1.2.2 Funktionen der Palmitoylierung

Die Funktionen von palmitoylierten Proteinen sind vielfältig und werden durch die im vorherigen Kapitel beschriebenen Mechanismen bestimmt. So ist z.B. die Proteinaktivität (Huang et al., 2010), der Proteintransport (Abrami et al., 2008 und 2006) und die Proteinstabilität (Maeda et al., 2010; Abrami et al., 2006) der modifizierten Proteine beeinflusst. Die Gruppe der Transmembranproteine, die post-translational modifiziert werden ist groß. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Zelladhäsionsmoleküle (Sharma et al., 2012; Van Itallie et al., 2005), Ionenkanäle und zelluläre Transporter (Mueller et al., 2010; Liu et al., 2012), Chaperone (Lakkaraju et al., 2012) sowie eine Vielzahl von viralen Proteinen (Blanc et al., 2013; Veit, 2012). Die Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht einiger viraler Proteine und deren durch Palmitoylierung bestimmte Funktionen, während des viralen Replikationszyklus.

Tab. 1-1 Übersicht der durch Palmitoylierung bestimmten Funktionen viraler Proteine.

Virales Protein	Funktion	Referenz
Influenza B Hämag-glutinin (HA)-Protein	Viruseintritt: Die Palmitoylierung des HA-Proteins ist verantwortlich für die Verankerung in Membrandomänen und fördert die Ausbildung von Fusionsporen während der Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran.	Ujike et al., 2004 Wagner et al., 2005
Hepatitis C Virus (HCV) Core-Protein	Viruszusammenbau: Die Palmitoylierung des HCV Core-Protein ist für die Interaktion des Nukleokapsid mit ER-Membranen und *Lipid droplets* während des Viruszusammenbaus verantwortlich.	Majeau et al., 2009
Togavirus 6K-Protein	Virusfreisetzung: Das palmitoylierungsdefiziente 6K-Proteins führt zu einer Akkumulierung von Viruspartikeln in Zellen und verhindert die Freisetzung der Viruspartikel.	Gaedigk-Nitschko et al., 1990

1.3 Zielformulierung

Die coronaviralen Spike (S)-Proteine weisen in ihrer zytoplasmatischen Domäne ein membrannahes cysteinreiches Motiv (CRM) auf. In dieser Region besteht wenig Sequenzhomologie zwischen den einzelnen S-Proteinen, jedoch weist der Gehalt an Cysteinen rund 35% auf. Die SARS-CoV und MHV S-Proteine besitzen neun und das TGEV S-Protein zehn Cysteinreste innerhalb des CRM. Die Cysteine können innerhalb dieser Sequenz in unterschiedliche Cluster aufgeteilt werden. Cysteinreiche Motive in einer membrannahen Proteinsequenz sind potentielle Acylierungsstellen für post-translationale Modifikationen mit langkettigen Fettsäuren, der sogenannten Palmitoylierung (S-Acylierung). Für die *Betacoronaviren* SARS-CoV und MHV konnte bereits gezeigt werden, dass deren S-Proteine am CRM palmitoyliert sind (Petit et al., 2007; Thorp et al., 2006).

Die Bedeutung der Palmitoylierung der SARS-CoV und MHV S-Proteine während des viralen Replikationszyklus konnten in einigen Studien verdeutlicht werden, wobei die unterschiedlichen Cystein-Cluster des CRM in ihrer Funktion unter den Virusspezies variieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung bei dem SARS-CoV S-Protein wichtig ist für die Fusion von Zell-und Zellmembran, wobei der membrannahe N-terminale Cystein-Cluster (fünf Cysteinreste) wichtig ist (McBride und Machamer, 2010). Allerdings ist für den Einbau des S-Proteins in virusähnliche Partikel (VLPs) der äußerste C-terminale Cystein-Cluster (zwei Cysteinreste) verantwortlich (Ujike et al., 2012). Bei MHV sind Cysteine hingegen am äußersten N-terminalen Ende des CRM ausreichend für einen erfolgreichen Einbau des Proteins in Viruspartikel (Yang et al., 2012). Die Erkenntnisse zur Interaktion von S- und Membran (M)-Protein sind ebenfalls kontrovers für SARS-CoV und MHV. Während die Palmitoylierung des MHV S-Proteins essentiell ist für die Interaktion mit dem M-Protein (Thorp et al., 2006) ist die S-Acylierung für die SARS-CoV S-M-Proteinwechselwirkung keine notwendige Bedingung (McBride und Machamer, 2010; Ujike et al., 2012).

Für Alphacoronaviren sind die Funktionen der Acylierung der S-Proteine während des Replikationszyklus noch nicht untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Palmitoylierung des S-Proteins bei dem *Alphacoronavirus* TGEV (*Transmssible gastro-*

enteritis virus) während des Replikationszyklus zu charakterisieren. Dazu wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wird das TGEV S-Protein post-translational durch die kovalente Verknüpfung mit der langkettigen, ungesättigten Fettsäure Palmitinsäure modifiziert?

2. Falls das TGEV S-Protein palmitoyliert wird, in welchem zellulären Kompartiment des sekretorischen Transportwegs, Endoplasmatisches Retikulum (ER), ER-Golgi intermediäres Kompartiment (ERGIC) oder Golgi-Apparat, findet die Modifikation statt?

3. Spielt die S-Acylierung des CRM des TGEV S-Proteins bei dem Einbau des S-Proteins in virusähnliche Partikel (VLPs) bzw. in Viruspartikel eine wichtige Rolle?

- Wenn ja, sind bestimmte Cystein-Cluster des CRM wichtig für den Einbau des S-Proteins?
- Findet ein Einbau von partiellen S-Cysteinmutanten in Viruspartikel statt, sind diese dann noch, wie das Wildtyp S-Protein in Viruspartikeln, fusionskompetent?

4. Spielt die Palmitoylierung des TGEV S-Proteins eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem TGEV M-Protein?

- Sind auch hier gegebenenfalls bestimmte Cystein-Cluster von einer höheren Bedeutung als andere Cluster für die erfolgreiche Proteinwechselwirkung?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von Transportsignalen des TGEV S-Proteins. Das TGEV S-Protein wird durch ein tyrosinbasiertes Retentionssignal (YXXθ) innerhalb der zytoplasmatischen Domäne, intrazellulär am Ort des Viruszusammenbaus zurückgehalten (Paul et al., 2014; Schwegmann-Weßels et al., 2004). Der Austausch des Lysins (+2 Aminosäurepositionen von der YXXθ-Sequenz) in ein Methionin, verwandelt das ursprüngliche Retentionssignal in ein Endozytosesignal. Die TGEV S_K/M-Mutante wird nicht mehr intrazellulär zurückgehalten, son-

dern wird an der Zelloberfläche exprimiert und endozytiert (Paul et al., 2014). Es wurde folgende Fragestellung untersucht:

- Welche Auswirkungen haben das Tyrosin-basierte Retentionssignal (YXXθ) und das durch K/M-Mutation entstandene Endozytosesignal des TGEV S-Proteins auf die Interaktion mit dem M-Protein?

2. Material

2.1 Eukaryotische Zelllinien

In dieser Arbeit wurde mit BHK 21-Zellen gearbeitet. BHK 21-Zellen sind Zellen aus Hamster-Nierengewebe (engl. baby hamster kidney cells). Diese permanenten Zelllinie stammt aus der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ in Braunschweig (Katalognummer: DSM ACC 61).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit ST-Zellen gearbeitet. Dies sind Schweinehodenzellen (swine testis), die von McClurkin und Norman im Jahr 1965 zum erstenmal isoliert wurden (McClurkin, 1965). Sie exprimieren die porcine Aminopeptidase N, die von TGEV als Rezeptorprotein genutzt wird und sind daher gut für Infektionsstudien mit TGEV geeignet.

Beide permanenten Zelllinien wurden von dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

2.2 Virus

TGEV

Der TGEV-Stamm PUR-46 MAD wurde in dieser Arbeit genutzt. Das ursprüngliche Virusisolat wurde von der Arbeitsgruppe L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnologia Madrid) aus Spanien zur Verfügung gestellt.

VSV

In dieser Arbeit wurde der VSV (Vesicular Stomatitis Virus)-Stamm Indiana benutzt. Dieser Stamm wurde von J. K. Rose aus New Haven (USA) dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule zur Verfügung gestellt.

2.3 Bakterien

Die Transformation von Plasmiden wurde mit dem *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm MRF‘ XL-1 Blue der Firma Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt.

2.4 *Complementary*-DNAs (cDNAs)

TGEV S-, M und E cDNAs

Die Zugangsnummer für die vollständige Genomsequenz des TGEV-Stamms PUR-46-MAD ist in der NCBI-Datenbank unter der Nummer AJ271965 zu finden. Die cDNA-Sequenzen des S-, M- und E-Proteins lagen im pCGI-Vektor vor und wurden von der AG Schwegmann-Weßels zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen der TGEV S-Proteine variieren untereinander. Bei den meisten Virusstämmen hat das S-Protein eine Länge von 1 449 AS. Das S-Protein des TGEV PUR-46 MAD Stamms hat jedoch zwei Aminosäuren weniger. Es fehlen die Aminosäuren an den Positionen 375 und 376 (1123-1128 bp). In dieser Arbeit wurde daher, um einen Vergleich mit anderen TGEV-Stämmen zu ziehen ebenfalls mit einer Länge von 1449 AS des S-Proteins ausgegangen. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der einzelnen Gene bzw. Proteine sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

TGEV S-K/M, S-Y/A, S-del26 und S-del35 cDNAs

In dieser Arbeit wurde mit TGEV S-Mutanten gearbeitet, die Mutationen im zytoplasmatischen Abschnitt aufweisen. Zum einen wurde mit der Mutante S_Y/A gearbeitet, in der das Tyrosin an der Position 1440 im Retentionssignal durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Des Weiteren wurde mit der S_K/M-Mutante gearbeitet, bei der das Lysin an der Position 1445 durch ein Methionin ausgetauscht wurde. Außerdem wurden Deletionsmutanten untersucht, bei denen die letzten C-terminalen 26 Aminosäuren (S-del26) oder die letzten C-terminalen 35 Aminosäuren (S-del35) entfernt wurden. Diese cDNAs lagen im pCGI-Vektor vor und wurden von der AG Schwegmann-Weßels zur Verfügung gestellt.

VSV G cDNA

Die Zugangsnummer für die vollständige Genomsequenz des VSV-Stamms Indiana ist in der NCBI-Datenbank unter der Nummer GI 9627229 zu finden. In dieser Arbeit wurde mit der VSV G cDNA gearbeitet, die im pCGI-Vektor vorlag. Die VSV G cDNA wurde genutzt, um Chimären des TGEV S- und VSV G-Proteins herzustellen. Diese cDNAs wurden ebenfalls von der AG Schwegmann-Weßels zur Verfügung gestellt. Im Anhang dieser Arbeit befinden sich die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus der NCBI-Datenbank der VSV G cDNA bzw. des VSV G-Proteins.

2.5 *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC)

pBAC_rTGEV

Das pBAC_rTGEV ist ein künstliches Bakterienchromosom (Bacterial Artificial Chromosome). Es erlaubt die Expression des vollständigen Genoms des TGEV-Stamms PUR-MAD, wobei das S-Protein-Gen aus dem TGEV-Stamm PUR-C11 stammt (Almazan et al., 2000). Das S-Gen des PUR-C11-Stamms hat 14 Nukleotidabweichungen im Vergleich zum PUR-MAD-Stamm und eine Insertion von sechs Nukleotiden am 5‘-Ende des Gens (Sanchez et al., 1999). Die pBAC_rTGEV DNA wurde von L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnologia Madrid) aus Spanien zur Verfügung gestellt.

pBAC_rTGEV_S_YI/AA

Bei diesem Konstrukt handelt es sich um die pBAC_rTGEV BAC-DNA in die Mutationen eingefügt wurden, die zu Aminosäureaustauschen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des S-Proteins führten. Bei der rTGEV_S_YI/AA-Mutante ist das Tyrosin-1440 und das Isoleucin-1443 jeweils gegen ein Alanin ausgetauscht. Diese BAC-DNA wurde in dieser Arbeit von der AG Schwegmann-Weßels zur Verfügung gestellt.

2.6 Plasmide

pCGI

In dieser Arbeit wurde mit dem pCGI-Plasmid-Vektor gearbeitet (Cathomen et al., 1995). Dieser Vektor wurde von R. Cattaneo aus Zürich (Schweiz) dem Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Die Expression der in diesen Plasmid-Vektor eingebrachten Gene stehen unter der Kontrolle des Zytomegalievirus (CMV)-Promotors. Zwischen dem CMV-Promotor und der *Multiple Cloning Site* (MCS) befindet sich ein Intron des β-Globin-Gens aus dem Kaninchen. Die Expression dieses Intron ermöglicht die Expression der eingebrachten Konstrukte über den Zellkern von eukaryotischen Zellen. Für die Selektion von plasmidtragenden Bakterien besitzt der pCGI-Vektor eine codierende Ampicillin-Resistenz.

2.7 Zellkulturmedien

2.7.1 Prokaryotische Zellkultur

LB-Medium, pH 7,0

Trypton	10 g
Natriumchlorid	10 g
Hefeextrakt	5 g
Dest. H_2O	ad 1 l

Das Medium wurde vor Verwendung autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Medium-Agarplatten wurden zu einem Liter LB-Medium 20 g Agar gegeben und ebenfalls autoklaviert. Zum Gießen der Platten wurde das Medium in der Mikrowelle erwärmt und gegebenenfalls Antibiotikum zugegeben.

2.7.2 Eukaryotische Zellkultur

Das EMEM und DMEM Fertigpulver wurde von der Firma GIBCO BRL bezogen. Für Antibiotika-haltiges Medium wurden pro 1 Liter Medium 0,06 g Penicillin und 0,05 g Streptomycin (Sigma) ins Medium gegeben. Der pH-Wert wurde durch CO_2-Begasung eingestellt und die Medien wurden vor Verwendung steril filtriert.

EMEM (Eagel's Minimal Essential Medium), pH 7,0

EMEM-Fertigpulver	9,6 g
$NaHCO_3$	2,2 g
Dest. H_2O	ad 1 l

DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium), pH 6,9

EDulb-Fertigpulver	13,53 g
$NaHCO_3$	2,20 g
Dest. H_2O	ad 1 l

Mangelmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO)

D-Glucose	4,5 g
L-Glutamin	4 mM
L-Methionin	---
L-Cystein	---
HEPES	10 mM

2.8 Radioaktivmarkierte Substanzen

^{3}H-Palmitinsäure:

Palmitinsäure, [9,10-^{3}H(N)], 5 mCi, Perkin Elmer

^{35}S-Methionin/Cystein:

EasyTagTM EXPRESS Protein labeling mix [35S], Perkin Elmer

2.9 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I, pH 9,0

1 M Tris-HCl	300 ml
Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 l

Anodenpuffer II, pH 7,4

1 M Tris-HCl	25 ml
Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 l

Blocking-Lösung

Blocking-Reagenz	1 % (w/v)
Blocking-Puffer	99 % (v/v)

DAPI-Lösung (1000x)

DAPI	1 mg
Ethanol	ad 100 ml

Ethidiumbromidfärbebad

Ethidiumbromid	1 g
TAE Puffer	ad 100 ml

Gradienten-Lysis-Puffer, pH 7,5

Dodecyl-Maltosid	6 mM
Tris	10 mM
NaCl	150 mM

+ Complete-Tablette/50 ml Puffer

HBS-Puffer (2x), pH 7,1

HEPES	1,20 g
NaCl	1,63 g
Na_2HPO_4	0,02 g
Aqua bidest.	ad 1 l
	steril filtriert

Hydroxylamin-Lösung, pH 7,0

Hydroxylamin	1 M, in dest. H_2O

Kathodenpuffer, pH 9,0

Aminocapronsäure	5,25 g
1 M Tris-HCl	25 ml
Ethanol	200 ml
Aqua bidest.	ad 1 L

Mowiol

Mowiol	2,50 g
Glycerol	6,00 g
Aqua bidest.	6,00 ml
0,2 M Tris pH 8,5	12,00 ml
DABCO	2,5 % (v/v)

NP-40-Lysispuffer, pH 7,5

Natriumdesoxycholat	0,50 %
Nonidet P40	1,00 %
Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
Proteaseinhibitor “Complete”	1 Tablette/50 ml (bei Bedarf)

PBS, pH 7,5

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KH_2PO_4	0,12 g
$MgCl_2$ x 6 H_2O	0,10 g
$CaCl_2$ x 2 H_2O	0,132 g
Aqua bidest.	ad 1 l

PBSM, pH 7,5

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4	1,15 g
KH_2PO_4	0,20 g
Aqua bidest.	ad 1 l

PBSM 0,1 % Tween

PBSM	2 l
Tween 20	2 ml

Sammelgel für PAGE, kleines Gel (1 Gel)

Aqua bidest.	0,68 ml
Acrylamidlösung 30%	0,17 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,13 ml
10% SDS (in H_2O)	10,00µl
10% APS (in H_2O)	10,00 µl
TEMED	2,00 µl

Sammelgel für PAGE, großes Gel (1 Gel)

Aqua bidest.	7,8 ml
Acrylamidlösung 30%	2,0 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,5 ml
10% SDS (in H_2O)	115 µl
10% APS (in H_2O)	115 µl
TEMED	10 µl

SDS Laufpuffer für PAGE, pH 8,4 (10x konzentriert)

SDS	10 g
Tris	30 g
Glycin	144 g
Aqua bidest.	ad 1 l

SDS-Probenpuffer (2x konzentriert)

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	10 ml
10% SDS-Lösung	20 ml
Glycerin	10 ml
Bromphenolblau	
(20 mg/ml in Reinstwasser)	2 %
Aqua bidest.	ad 50 ml

TAE-Puffer (1x konzentriert), pH 8,0

Tris	40 mM
Natriumacetat	20 mM
EDTA	2 mM
Aqua bidest.	ad 1 l

TBE-Puffer (1x konzentriert), pH 8,0

Tris	10 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM
Aqua bidest.	ad 1 l

TFB I, pH 5,8, sterilfiltriert

CaCl2	10mM
Glycerin	15 %
Kaliumacetat	30 mM
Rubidiumchlorid	100 mM
Manganchlorid	50 mM

TFB II, pH 7,0, sterilfiltriert

MOPS	10 mM
Rubidiumchlorid	10 mM
CaCl2	75 mM
Glycerin	15 %

Trenngellösung für PAGE, 8%, kleines Gel (1 Gel)

Aqua bidest.	2,30 ml
Acrylamidlösung 30%	1,30 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,30 ml
10% SDS (in H_2O)	50 µl
10% APS (in H_2O)	50 µl
TEMED	16 µl

Trenngellösung für PAGE, 10%, kleines Gel (1 Gel)

Aqua bidest.	2,00 ml
Acrylamidlösung 30%	1,70 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	1,30 ml
10% SDS (in H_2O)	50 µl
10% APS (in H_2O)	50 µl
TEMED	4 µl

Trenngellösung für PAGE, 6%, großes Gel (1 Gel)

Aqua bidest.	17,5 ml
Acrylamidlösung 30%	5,2 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	7,7 ml
10% SDS (in H_2O)	310 µl
10% APS (in H_2O)	310 µl
TEMED	23 µl

Trypsin 0,125%, pH 7,0

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na_2HPO_4 x 12 H_2O	2,31 g
KH_2PO_4 x 2 H_2O	0,20 g
$CaCl_2$	0,13 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	0,10 g
Trypsin	1,25 g
Versen (EDTA)	1,25 g
Streptomycin	0,05 g
Penicillin	0,06 g
Aqua bidest. (steril)	ad 1 l

2.10 Antibiotika

Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Roth
Penicillin	Sigma
Streptomycin	Sigma

2.11 Zellkulturzusätze

Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Mycoplex Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
L-Glutamin	PAA Laboratories
Natriumpyruvat	Gibco/Invitrogen

2.12 Primer (synthetische Oligonukleotide)

Die in dieser Arbeit genutzten Primer (Oligonukleotide) wurden von der Firma SIGMA synthetisiert. Die Konzentration der Primer-Gebrauchslösungen betrug 10 µM.

Tab. 2-1 Übersicht der verwendeten Primer. S: Sense-Primer, AS: Antisense-Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1	pCGI-AS	CCAACACACTATTGCAATG
2	TGEV (3772-3796)-S	CTAGATGACAAGTTCTATTTGACCC
3	TGEV S_C_{4-7}A-S	TGTAGTACAGGTGCCGCCGGAGCCATAGGTGCC TTAGGAAGTTGT
4	TGEV S_C_{4-7}A-AS	ACAACTTCCTAAGGCACCTAGGCTCCGGCGGCAC CTGTACTACA
5	TGEV S_C_{8-10}A-S	TTAGGAAGTGCCGCCCACTCTATAGCCAGTAGAA GA
6	TGEV S_C_{8-10}A-AS	ACCTGTACTGGCGGCGGCAAATAGCAGTAATGG
7	TGEV S_C_{1-3}A-S	CCATTACTGCTATTTGCCGCCGCCAGTACAGGT
8	TGEV S_C_{1-3}A-AS	GGATCCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCC
9	TGEV S_C_{4-7}A-S-2	GGTGCCGCTGGAGCCATAGGTGCTTTAGGA
10	TGEV S_C_{4-7}A-AS-2	TCCTAAAGCACCTATGGCTCCAGCGGCCACC
11	TGEV-M-HA-AS_PstI	CGCGCTGCAGTTAAGCGTAATCTGGAACATCG TATGGGTACATTACCATATTAATTTTTCTTGCTC
12	TGEV-M-S_BamHI	TTTGGATCCATGAAGATTTTGTTAATATTAGCGT GTGTG

2.13 DNA- und Proteingrößenstandards

Gene Ruler 1 kb Ladder Plus	Fermentas
Gene Ruler 100 bp Ladder Plus	Fermentas
PAGE Ruler Plus prestained	Thermo Scientific

2.14 Plaque-Test

SeaPlaque Agarose	Lonza
Neutralrot	Merck

2.15 Enzyme

2.15.1 Restriktionsendonukleasen

BamHI (#ER0051)	Thermo Scientific
ClaI (#ER0141)	Thermo Scientific
EcoRI (#ER0271)	Thermo Scientific
PstI (#ER0611)	Thermo Scientific
SpeI (#ER1251)	Thermo Scientific
XhoI (#ER0695)	Thermo Scientific

2.15.2 Sonstige Enzyme

T4 DNA Ligase (#EL0016)	Thermo Scientific
Phusion Polymerase (#F-530L)	Thermo Scientific
Taq Polymerase (#EP0402)	Thermo Scientific
FastAP Alkalische Phospatase (#EF0651)	Thermo Scientific

2.16 Antikörper

Primäre Antikörper

Tab. 2-2 Übersicht der verwendeten primären Antikörper

Antikörper/Epitop	Herkunft	Verdünnung/ Anwendung	Bezugsquelle
α-TGEV S-Protein, Epitop: 6A.C3	aus Maus	IFA (1:200) WB (1:200) IP (1:250)	L. Enjuanes, Madrid
α-TGEV M-Protein, Epitop: 9D.B4	aus Maus	IFA (1:200) WB (1:200)	L. Enjuanes, Madrid
α-HA-Peptid	aus Kaninchen	IFA (1:200) WB (1:200)	Sigma-Aldrich, #H6908
α-VSV G-Protein	aus Maus	IFA (1:500)	Institut für Virologie, TiHo Hannover

Sekundäre Antikörper

Tab. 2-3 Übersicht der sekundären Antikörper

Antikörper/Epitop	Herkunft	Verdünnung/ Anwendung	Bezugsquelle
α-Maus Cy3-gekoppelt	aus Schaf	IFA (1:300)	Sigma
α-Kaninchen FITC-gekoppelt	aus Ziege	IFA (1:300)	Sigma
α-Maus POD-gekoppelt	aus Kaninchen	WB (1:1000)	Dako
α-Kaninchen POD-gekoppelt	aus Schwein	WB (1:1000)	Dako

2.17 Kits

NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoBond BAC100	Macherey-Nagel
QIAprep Spin-Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

2.18 Substrate

Super Signal West Dura	Thermo Scientific
Cell proliferation reagent WST-1	Roche
Streptavidin-biotinylated POD	GE Healthcare

2.19 Transfektionsreagenzien

Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
Polyethylenimine (PEI)	Polysciences

2.20 Chemikalien sonstige Reagenzien

Acrylamidlösung (30%)	Roth
Amino-n-caproic Säure	Biozym
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Blocking-Reagenz	Roche
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth
Complete-Proteinase Inhibitor	Roche
DEPC-H_2O	Roth
Dimethylsulfoxid	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
Dodecyl β-D-maltoside, >98% (GC)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Ethanol	Merck

EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce
Glukose	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Roth
HCl	Roth
Isopropanol	Roth
KCl	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Magnesiumsulfat	Roth
Methanol	Roth
Mowiol	Calbiochem
N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin	Roth
Natriumacetat	Merck
NaCl	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nitrocellulose-Membran Protran BA 85	GE Healthcare
Nonidet P 40	Roche
Paraformaldehyd	Sigma
Protein-A-Sepharose	Sigma
Saccharose	Roth
Tris-Hydroxymethylaminomethan	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Roth
Tween 20	Roth

2.21 Sonstiges

Protein A-Sepharose	Sigma-Aldrich
OPTI-MEM, Serumreduziertes Medium	Lifetechnologies

2.22 Gerätschaften

Agarosegelelektrophorese

Gelträger, Kammer, Kämme	Keutz
Mikrowellengerät Micromat	AEG
UV-Transilluminator	Amersham
PowerPac200/300	Bio-Rad

Autoklav

Autoklav Typ A5	Webeco

Bakterienzellkultur

Petrischalen, 10 cm	Greiner
Reagenzröhrchen, 15 ml	Greiner
Reagenzröhrchen, 50 ml	Greiner
Erlenmeyerkolben, 100, 300 ml	Jürgens
Brutschrank Typ B 16	Heraeus
Thermomixer compact	Eppendorf

Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskop EM10C	Zeiss
Grids, PY 200 Cu-X	Science Services

Eukaryotische Zellkultur

Zellkulturflaschen, 75 cm^2	Nunc
24-*well*-Platte	Greiner
6-well-Platte	Greiner
Zellkulturschale, Ø 10 cm	Greiner
CO_2 Inkubator	Heraeus
Schwenktisch, elektrisch	Keutz
Überkopfschwenker REAX 2	Heidolph
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor

Magnetrührer

Magnetrührer, RTC basic	IKA Labotechnik

Mikroskope

Leica TCS SP5	Leica Microsystems
Axiophot 2	Zeiss
Axiovert 25	Zeiss
Nikon ECLIPSE Ti	Nikon

PCR

Gene Quant RNA/DNA	
Calculator	Pharmacia Biotech
Primus 25/96 Thermocycler	MWG Biotech
Primus 96 PLUS	MWG Biotech
0,2 ml Reaktionsgefäße	Biozym

pH-Meter

pH-Meter	Jürgens

Photometer

BioPhotometer Plus	Eppendorf

Pipetten

10, 100, 1000 µl	Eppendorf
1, 2, 5, 10, 20 ml Glaspipetten	Jürgens

Pipettierhilfen

Accu Jet Pipettierhilfe	Brand

Radioaktive Versuche

Optima XL-100K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Rotor SW 40 Ti	Beckman Coulter
Gradient Maker SG 15	Hoefer
Gießmaschine LKB PumpP-1	Pharmacia

Pumpe KNF(Geltrockner)	Neuberger Laboport
Geltrockner	Biometra
Molecular Imager FX (Phosphoimager)	Biorad
Quantitiy One 4.1.1	Biorad
Belichter Raytest	Eraser
SDS-PAGE Laufkammer,	
Protean II xiCell	Biorad
Imaging plate, BAS-MS 2025	Fujifilm
Hochsensitiver Röntgenfilm, XOMAT AR, Kodak	Sigma-Aldrich

SDS-PAGE und Westernblotkammer

Slab Gelkammer	Keutz
Filterpapier	Whatman
Nitrocellulose Membran,	
Protran BA85	GE Healthcare
Transferkammern,	
Typ B 43 und B 44	Biometra
TransBlot SD	Biorad
Chemi Doc	Biorad
Quantity One V 4.4.0 (Software)	Biorad

Vortexer

Tisch-Vortexer	VWR

Waagen

Elektronische Analysenwaage,	
Typ 1712 MP 8	Sartorius
Portable Waage Lauda A100	Sartorius

Wasserbad

Wasserbad	GFL

Sicherheitswerkbänke

NUAIRE Klasse 2, TypA/B3	Nuaire
Biowizard	Kojair

Zentrifugen/Rotoren

Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
L8-70M Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Rotor SW 41	Beckman Coulter
Eppendorf Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Megafuge 1,0R	Heraeus

2.23 Software

Quantity One 4.1.1	Biorad
NIS-Elements AR 3.2	Nikon
Adobe Photoshop 7.0	Adobe

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellpassage

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5%-iger CO_2-Atmosphäre in 75 cm^2-Zellkulturflaschen. Je nach Wachstum der unterschiedlichen Zelllinien erfolgte das Passagieren der Zellen alle zwei bis vier Tage. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Versen- Trypsin-Lösung entweder bei Raumtemperatur (BHK 21-Zellen) oder bei 37°C (ST-Zellen) inkubiert. Durch mikroskopische Beobachtung wurde das Ablösen der Zellen beurteilt und durch Zugabe von FKS der Trypsinierungsvorgang abgestoppt. In geeigneten Verdünnungen mit neuem Medium und FKS-Zusatz wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen passagiert. Die Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht der verwendeten Zelllinien, ihrer Medien und der FKS-Supplementierung.

Tab. 3-1 Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und FKS-Zusatz

Zelllinie	Medium	FKS [%]
BHK 21-Zellen	EMEM	5
ST-Zellen	EDULB	10

3.1.2 Zellaussaat

Für die unterschiedlichen Versuche mussten definierte Zelldichten in den entsprechenden Zellkulturgefäßen vorliegen. Dazu wurde die Zellzahl nach Trypsinierung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Tabelle 3-2 gibt eine Übersicht der Zelllinien und ihrer ausgesäten Zellzahlen in die unterschiedlichen Zellkulturgefäße.

Tab. 3-2 Übersicht der ausgesäten Zelltiter in die unterschiedlichen Zellkulturgefäße.

Zellkulturgefäß	Mediumvolumen pro *well*/Schale [ml]	BHK 21-Zellen [Zellen/ml]	ST-Zellen [Zellen/ml]
96-*well*-Platten	0,1	---	180.000
24-*well*-Platten	1	150.000	220.000
6-*well*-Platten	3	180.000	220.000
35mm-Schalen	3	180.000	220.000
10cm-Schalen	12	220.000	250.000
15cm-Schalen	20	---	300.000

3.1.3 Kryokonservierung und auftauen von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden zur längerfristigen Lagerung kryokonserviert. Die Lagerung der Kryos-Stocks erfolgte bei -80 °C und -150°C. Für die Krokonservierung wurden die Zellen, die eine Tag zuvor passagiert wurden, trypsiniert (3.1.1). Das Trypsin wurde durch eine Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4 °C) von den Zellen getrennt und das Zellpellett wurde in Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus dem entsprechenden Kultivierungsmedium mit 10%igen Zusatz FKS und 10%igen Zusatz Glycerol. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in 0,750 ml (-80°C-Kryogefäße) bis 1,0 ml (-150°C-Kryogefäße) Aliquots und erfolgte schrittweise. Dazu wurden die Zellen zunächst für 1 h bei 4°C, für 2 h bei -18°C, und für 4 h bei -80°C (entsprechend länger für die -80 °C-Lagerung) und dann bei -150°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte rasch in einem 37°C-Wasserbad. Nach dem alle Gefrierkristalle aufgetaut waren wurden die Aliquots in 5 ml Kulturmedium mit 20%igen Zusatz FKS in 25cm^2-Zellkulturflaschen. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel oder die Passage in eine größere Zellkulturflasche (3.1.1).

3.1.4 Mykoplasmen-Test

In regelmäßigen Abständen (alle 2-3 Monate) erfolgte eine Mykoplasmen-PCR der verwendeten Zelllinien.

3.1.5 WST 1-Test

Der WST 1-Test in ein Verfahren um die Zellproliferation, Zytotoxizität und Viabilität von Zellen zu quantifizieren. Er wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um einen zytotoxischen Effekt der 2-Bromopalmitat (2-BP)-Behandlungen auszuschließen. Der Test basiert auf der enzymatischen Umsetzung des Tetrazoliumsalz WST 1 durch die mitochondrialen Succinyl-Dehydrogenasen. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht das dunkel-gelbe Formazan, welches bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann. Der Gehalt an gebildetem löslichen Formazan korreliert mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen und wurde in diesem Experiment der Zellproliferation gleichgesetzt.

Dazu wurden ST-Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät (3.1.2). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen 2-BP (0,8; 4,0; 8,0; 12,0 µM) in einem Doppelansatz behandelt. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Medium oder nur mit Ethanol (Lösungsmittel von 2-BP) behandelt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für eine Positivkontrolle wurden Zellen für 1 h mit DMSO inkubiert. Danach wurden alle Zellen in der 96-*well*-Platte dreimal mit PBS gewaschen. 50 µl der 10 %-igen WST 1-Lösung wurden in jedes well pipettiert. Als Blindwert diente ein well mit WST-1-Lösung ohne Zellen. Die Platte wurde für 1 h bei 37°C inkubiert, und abschließend wurde die Absorption bei 450 nm in einem Mikroplatten-ELISA-Reader bestimmt.

3.2 Virologische Methoden (nicht-radioaktiv)

3.2.1 Infektion mit TGEV und VSV

Es wurden BHK 21-Zellen oder ST-Zellen in 6-well-Formaten bzw. 15cm-Schalen ausgesät (3.1.2). Die Zellen wurden für ein bis zwei Tage bei 37°C inkubiert bis sich

ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hat. Dann erfolgte die Infektion mit TGEV oder VSV (Tab. 3-3), wobei die ST-Zellen mit TGEV und die BHK 21-Zellen mit VSV infiziert wurden.

Tab. 3-3 Übersicht der verwendeten MOI (Multiplicity of infection) von TGEV und VSV

	TGEV MOI	VSV MOI
Plaque-Assay	0,001	0,001
Radioaktive Markierung	10	---

3.2.2 2-BP-Behandlung der Zellen

Für die Behandlung mit 2-BP wurde nach der einstündigen Infektion mit TGEV bzw. VSV (3.2.1) frisches Medium in die *wells* gefüllt mit definierten Konzentrationen von 2-BP (0,8; 4,0; 8,0 und 12,0 µM). Die Zellen wurden für mindestens 18 h inkubiert bis ein zytopathischer Effekt der Zellen zu sehen war, und die Zellkulturüberstände wurden abgenommen. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden sie für 10 min bei 4°C bei 2800 x g zentrifugiert. Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel wurde mit Hilfe des Plaque-Tests (3.2.3) quantifiziert.

3.2.3 2-BP Plaque-Test

Der Plaque-Test ist eine virologische Methode, um die Anzahl von infektiösen Viruspartikeln in einer Virussuspension zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde er genutzt, um die gebildeten infekiösen Viruspartikel in Zellkulturüberständen von 2-BP behandelten Zellen (3.2.2) zu quantifizieren.

Für den Plaque-Test wurden ebenfalls wieder BHK 21-Zellen oder ST-Zellen in 6-well-Platten ausgesät (3.1.2) und mit den Überständen (3.2.1) der 2-BP behandelten Zellen infiziert. Dabei wurden die Zellkulturüberstände in Zehnerpotenzen ($1x10^{-2,5}$ bis $1x10^{-5}$) verdünnt, um später die PFU/ml berechnen zu können. Die BHK 21-Zellen wurden mit den VSV-Zellkulturüberständen infiziert, die ST-Zellen mit den TGEV-Zellkulturüberständen. Die Infektion erfolgte für 1 h bei 37°C auf einem Schwenk-

tisch. Danach wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen wurde vorsichtig einmal mit PBS gewaschen und der Plaque-Test wurde durchgeführt.

Für den Plaque-Test wurde 1,6 %ige Plaque-Agarose in H_2O für 30 min autoklaviert und in einem 50°C-Wasserbad abgekühlt. Die flüssige Plaque-Agarose wurde mit 2xDMEM und 4% FKS 2:1 gemischt. 3 ml dieses Agarose-Mediumgemischs wurden pro ein 6-*well* pipettiert. Sobald sich die Agarose verfestigt hat wurden die 6-*well*-Platten bei 37°C inkubiert.

Die Länge der Inkubation richtete sich nach dem entsprechenden Virus. So wurden die mit VSV infizierten Platten bereits nach 24 h ausgewertet, die mit TGEV infizierten Platten erst nach 48 h. Die Auswertung erfolgte mit einer Neutralrot-Färbung der lebenden, nicht infizierten Zellen. Dazu wurde Plaque-Agarose 1:10 mit PBS verdünnt, für 30 min autoklaviert und in einem 50°C warmen Wasserbad abgekühlt. Die Plaque-Agarose wurde mit 37°C-warmer 0,025%-igen Neutralrot-Lösung zu gleichen Teilen gemischt. 1 ml davon wurde auf die Zellen in jede Vertiefung pipettiert und für 4-6 h inkubiert. Dann erfolgte die Auswertung des Plaque-Tests durch Auszählung der sichtbaren Plaques.

3.2.4 rTGEV-Komplementierungs-Assay

Für den rTGEV-Komplementierungs-Assay wurden BHK 21-Zellen (3.1.2) einen Tag vor Transfektion in 35mm-Schalen ausgesät. Die Transfektion der rTGEV-BAC-DNAs erfolgte mit Lipofectamine (3.5.2) nach dem folgenden Transfektionsschema in Tabelle 3-4.

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden für die Transfektion 12 µl Lipofectamine pro 35mm-Schale eingesetzt und der Ansatz des Transfektionsgemisch erfolgte in OPTI-MEM.

Zwei Tage p.t. wurden ST-Zellen mit den Zellkulturüberständen der transfizierten BHK 21-Zellen infiziert. 200 µl der Zellkulturüberstände wurden auf je ein 24-well, mit ST-Zellen, pipettiert und für 1 h bei 37°C geschwenkt. Nach dieser Zeit wurden die 24-wells mit 1 ml EDULB aufgefüllt und für 1 bzw. 2 Tage bei 37°C inkubiert.

Tab. 3-4 Transfektionsschema des rTGEV-Komplementierungs-Assays

Transfektionsansatz	je 4 µg DNA	je 1 µg DNA
1	rTGEV-Swt	+ p
2	rTGEV-S_YI/AA	+ p
3	rTGEV-S_YI/AA	+ Swt
4	rTGEV-S_YI/AA	+ S_C_{1-10}A
5	p (mock)	

Die Auswertung erfolgte durch eine Immunfluoreszenzanalyse (IFA) der Deckgläschen (3.6.1). Die IFA des Transfektionsansatz (Nr. 1, Tab. 3-4) mit rTGEV-Swt und leerem Vektor wurde nach einem Tag durchgeführt, die IFA der anderen Ansätze (Nr. 2-5, Tab. 3-4) nach zwei Tagen. Dabei wurde das TGEV S-Protein intrazellulär detektiert und eine DAPI-Färbung der Zellkerne durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem Nikon Eclipse Ti-Mikroskop bei 100x Vergrößerung.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 PCR-Techniken

3.3.1.1 DNA-Amplifikation mittels Phusion-PCR

Die PCR (*Polymerase chain reaction*) ist eine Methode um DNA *in vitro* zu amplifizieren. Für die Amplifikation von DNA während der Klonierung wurde die Phusion-Polymerase verwendet. Dieses Enzym hat neben seiner 5‘-3‘-Polymeraseaktivität auch eine 5‘-3‘-Exonukleaseaktivität. D.h. die Polymerase besitzt einen Kontrollmechanismus und verhindert die Entstehung von ungewünschten Mutationen in den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten. In der Tabelle 3-5 ist das Pipettierschema der PCR dargestellt.

Tab. 3-5 Pipettierschema des Phusion-PCR-Ansatzes

DEPC-H_2O	ad 50 µl
5 x GC-Phusion-Puffer	10
dNTP (10 mM)	1
Template-DNA	x µl (~ 50-250 ng)
Primer Sense (10 µM)	2,5 µl
Primer Antisense (10 µM)	2,5 µl
Phusion-Polymerase	1 unit/50 µl-Ansatz

Die Elongationszeit in der PCR wurde dem zu amplifizierenden DNA-Fragment angepasst, wobei die Polymerase 15 bis max. 40 sec für 1 kb benötigt. Das PCR-Profil ist in Tabelle 3-6 zu sehen.

Tab. 3-6 PCR-Profil der Phusion-PCR

Temperatur	Zyklusdauer	Zyklenanzahl
95 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	
58 °C – 0,2 °C	60 sec	10
72 °C	15 - max. 40 sec/1 kb	
95 °C	30 sec	
56 °C	60 sec	15
72 °C	15 - max. 40 sec/1 kb	
72 °C	5 min	1
4 °C	Bis zum Abbruch	1

Nach dem Lauf der PCR wurden die Ansätze in einer TAE-Gelektrophorese (3.3.5) aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt (3.3.6) und lagen für die weitere Klonierung, d.h. Restriktionsverdau (3.3.4), Dephosphorylierung (3.3.7) und Ligation (3.3.8) vor.

3.3.1.2 Hybridisierungs-PCR

Mit Hilfe der Hybridisierungs-PCR ist es möglich Mutationen innerhalb eines Gens einzubringen. In der Abbildung 3-1 ist der Ablauf einer Hybridisierungs-PCR zur Klonierung dargestellt. Zunächst werden zwei unabhängige PCRs (A und B) zur Erzeugung von DNA-Fragmenten mit überlappenden DNA-Strängen durchgeführt. Dazu werden in jeder PCR jeweils ein Primer mit überlappender Sequenz (A-2 und B-2) verwendet, der komplementär zu einer Sequenz des anderen PCR-Produkts ist. Die jeweiligen überhängenden DNA-Einzelstränge werden in der Hybridisierungs-PCR hypridisiert. Ist die Hybridisierungs-PCR (Tab. 3-7) abgeschlossen, werden die endständigen Primer A-1 und B-2 in den Reaktionsansatz pipettiert und eine Phusion-PCR (3.3.1.1) wird gestartet.

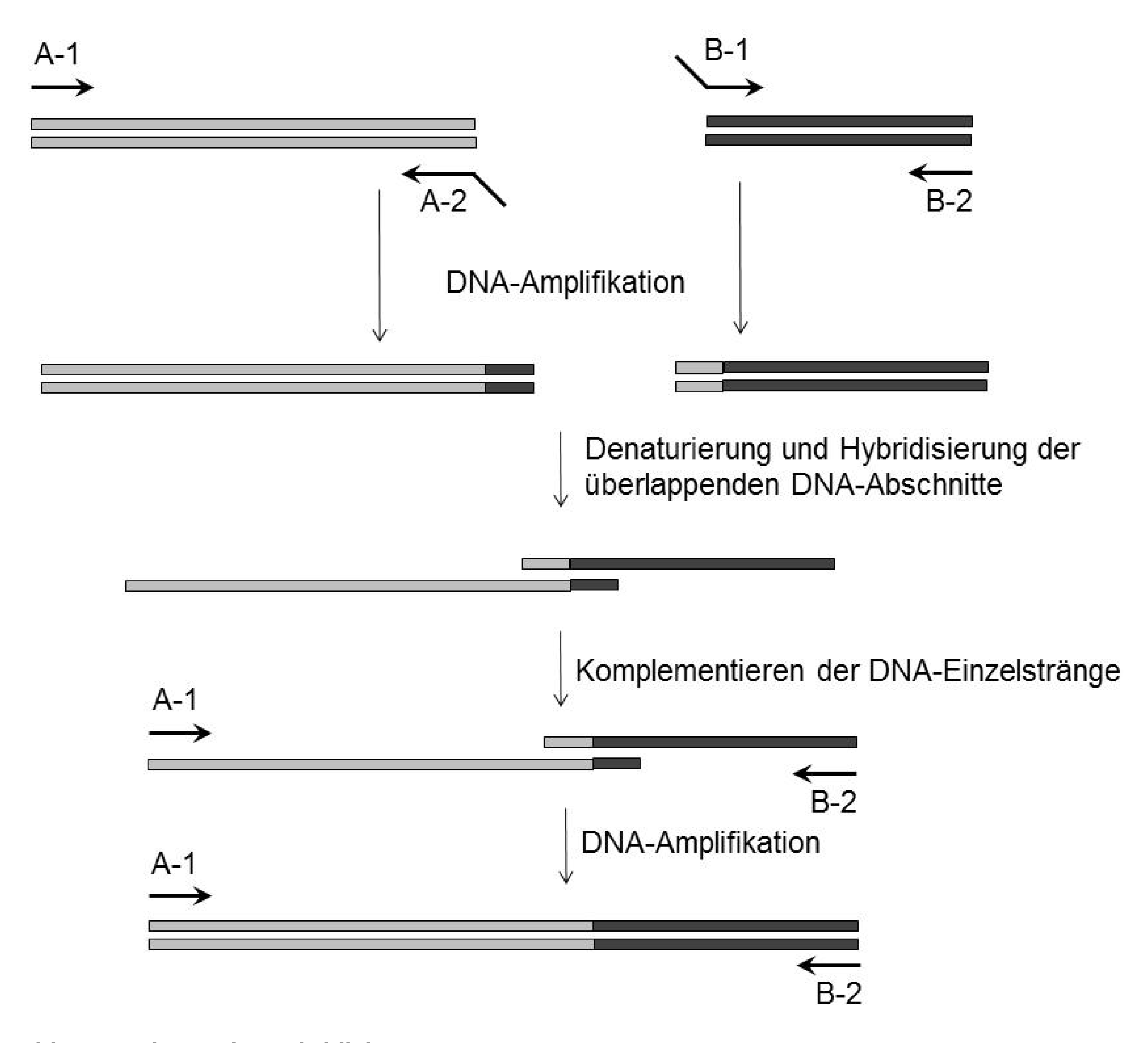


Abb. 3-1 Schema der Hybridisierungs-PCR

Das Pipettierschema für den Ansatz der Hybridisierungs-PCR ist in Tabelle 3-7 zu finden. Das PCR-Profil der Hybridisierungs-PCR ist in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tab. 3-7 Pipettierschema der Hybridisierungs-PCR. * Zugabe nach dem Hybpridisierungs-PCR-Lauf

DEPC-H_2O	ad 45 µl
5 x GC Phusion Puffer	10
dNTP (10 mM)	1
PRC-Produkt A	x µl (~ 50-250 ng)
PRC-Produkt B	x µl (äquimolares Verhältnis zu PCR-Produkt A)
Phusion-Polymerase	1 Unit/50 µl Ansatz
Primer A-1*	2,5 µl
Primer B-2*	2,5 µl

Tab. 3-8 PCR-Profil der Hybridisierungs-PCR

Temperatur	Zyklusdauer	Zyklenanzahl
95 °C	1 min	1
95 °C	30 sec	
58 °C	30 sec	2
72 °C	3 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	bis zum Abbruch	1

3.3.1.3 Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR war es möglich, ligierte Insert-Fragmente in Plasmid-Vektoren nach einer Klonierung zu detektieren. Zunächst wurden dafür 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 250 µl LB-Medium ohne Antibiotikum vorbereitet. Dann wurden PCR-Reaktionssgefäße vorbereitet, in denen 15 µl des Kolonie-PCR-Ansatzes (Tab. 3-9) vorgelegt wurden.

Tab. 3-9 Zusammensetzung des Kolonie-PCR-Ansatzes für eine PCR

DEPC-H_2O	Ad 15 µl
10x *Taq*-Puffer	1,5 µl
$MgCl_2$	1,2 µl
dNTP (10 mM)	0,3 µl
Primer Sense (10 µM)	0,45 µl
Primer Antisense (10 µM)	0,45 µl
***Taq*-Polymerase**	0,1 µl

Dann wurden einzelne Kolonien der transformierten E. coli (3.4.2) mittels einer 10 µl Pipettenspitze gepickt und 10 x in das PCR-Reaktionsgefäß und anschließend 10x in das LB-Medium-Reaktionsgefäß resuspendiert. Dadurch stand der Bakterienklon in der PCR-Reaktion und gleichzeitig für eine Vermehrung im LB-Medium zur Verfügung. Die Kolonie-PCR wurde mit spezifischen Primern für das entsprechende Insert und den Plasmid-Vektor durchgeführt. Das Primerpaar wurde so gewählt, dass ein Primer im Insert, der andere Primer im Vektor gebunden hat. Die PCR wurde unter den in Tabelle 3-10 aufgeführten Bedingungen gefahren.

Tab. 3-10 PCR-Profil der Kolonie-PCR

Temperatur	Zyklusdauer	Zyklenanzahl
95 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	
54 °C	30 sec	30
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	1
4 °C	Bis zum Abbruch der PCR	1

Als Positivkonrolle in der PCR dienten je 2 µl aus dem Ligations- bzw. Religationsansatz. Während des Laufs der PCR wurden die angeimpften Klone bei 37 °C angeschüttelt. Nach dem PCR-Lauf wurden die einzelnen Klone in einer TBE-

Gelektrophorese (3.3.5) analysiert. Positive Klone wurden für eine Mini-Präparation (3.4.3.1) angeimpft und zur Sequenzierung mit entsprechenden Primern eingeschickt.

3.3.2 Klonierung TGEV S-Cysteinmutanten

Die Klonierung der TGEV S-Cysteinmutanten erfolgte durch Hybridisierungs-PCR (3.3.1.2). Das Schema der Klonierung ist in Abb. 3-2 zu sehen.

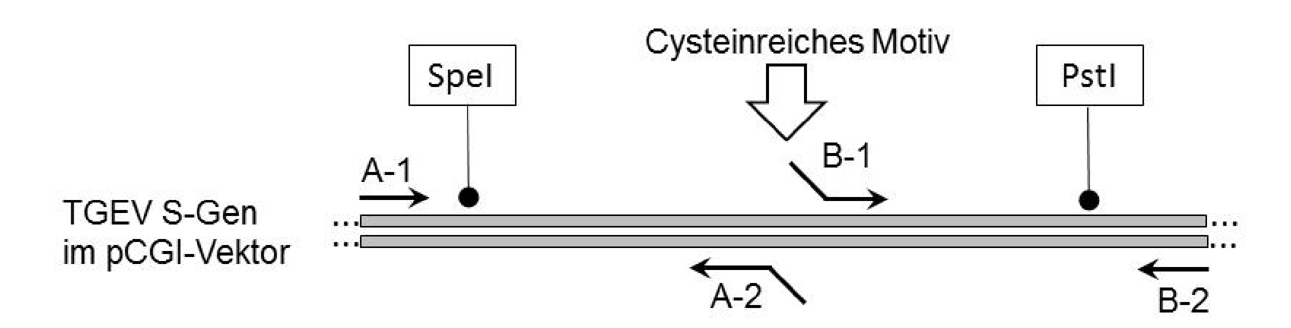


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Klonierung der TGEV S-Cystein-Mutanten.

Die endständigen Primer (Sequenzen s. Materialteil 2.12) waren in den Klonierungen der pCGI-Antisense-Primer Nr. 1 (B-2) und der TGEV (3772-3796)-Sense-Primer Nr. 2 (A1). Der TGEV (3772-3796)-Sense-Primer bindet 54 bp vor der SpeI-Schnittstelle im TGEV S-Gen. So war es möglich nur das Ende des Gens zu manipulieren und durch entsprechende Restriktion der amplifizierten DNA-Fragmente mit SpeI und PstI (3.3.4) wieder in das pCGI-Plasmid mit enthaltenem TGEV S-Gen zu ligieren (3.3.8). Die Primer, die überlappende DNA-Sequenzen erzeugten, enthielten die einzufügenden Mutationen des cysteinreichen Motivs des S-Proteins und sind in der Tabelle 3-11 aufgelistet. Die Template DNA war entweder das TGEV S-Gen mit Mutation im Tyrosinsignal (Y/A) oder das TGEV S-Gen codierend für das S-Wildtypprotein im pCGI-Vektor. Für Mutationen mit mehr als drei Cysteinen wurde dementsprechend eine zuvor klonierte Cys-Mutante als Template-DNA herangezogen (Tab. 3-11).

Tab. 3-11 Übersicht der verwendeten Primer während der Klonierung der TGEV S-Cystein-Mutaten.
Die Sequenzen der Primer sind im Materialkapitel 2.12 zu finden.

Konstrukt	Primer-Paar (A-2 und B-1)	Template-cDNA
$S_C_{1-3}A$	7 + 8	TGEV Swt
$S_C_{1-3}A_Y/A$	7 + 8	TGEV S_Y/A
$S_C_{4-7}A$	3 + 4	TGEV Swt
$S_C_{4-7}A_Y/A$	3 + 4	TGEV S_Y/A
$S_C_{8-10}A$	5 + 6	TGEV Swt
$S_C_{8-10}A_Y/A$	5 + 6	TGEV S_Y/A
$S_C_{1-7}A$	7 + 8	TGEV $S_C_{4-7}A$
$S_C_{1-7}A_Y/A$	7 + 8	TGEV $S_C_{4-7}A_Y/A$
$S_C_{4-10}A$	9 + 10	TGEV $S_C_{8-10}A$
$S_C_{4-10}A_Y/A$	9 + 10	TGEV $S_C_{8-10}A_Y/A$
$S_C_{1-10}A$	5 + 6	TGEV $S_C_{1-7}A$
$S_C_{1-10}A_Y/A$	5 + 6	TGEV $S_C_{1-7}A_Y/A$

3.3.3 Klonierung TGEV M-HA

Die Klonierung des TGEV M-HA-Konstrukts ist in Abb. 3-3 schematisch dargestellt. Das HA-Peptid wurde am C-Terminus des TGEV M-Proteins fusioniert. Dazu wurde der Antisense-Primer Nr. 11 (2, Abb. 3-3) in der PCR eingesetzt, der die HA-Peptid-Sequenz, ein Stopcodon und eine PstI-Schnittstelle enthielt. Der Sense-Primer Nr. 12 (1, Abb. 3-3) enthielt eine BamHI-Schnittstelle und ermöglichte die Amplifikation des vollständigen M-Gens mittels Phusion-PCR (3.3.1.1). Die Sequenzen der verwendeten Primer 11 und 12 sind im Materialteil 2.12 zu finden.

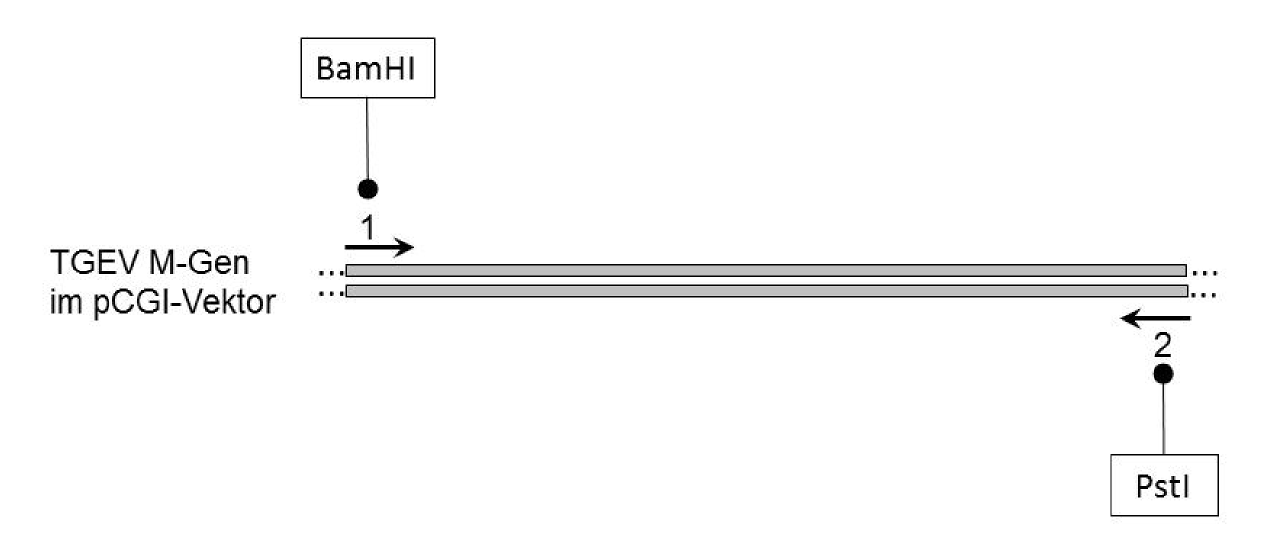


Abb. 3-3 Schematische Darstellung der Klonierung des TGEV M-HA-Konstrukts.

3.3.4 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde in dieser Arbeit zur Ligation von Insert-DNA-Elementen in Plasmid-Vektoren oder zu analytischen Zwecken der präparierten BAC-rTGEV-DNAs verwendet. Die eingesetzte Enzymmenge (Unit) richtete sich nach der zu spaltenden DNA-Menge und erfolgte nach Herstellerangaben. PCR-Produkte wurden über Nacht, Plasmid-Vektoren für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die BAC-rTGEV-DNAs wurde nach jeder Präparation durch den Verdau mit Restriktionsenzymen kontrolliert. Die Inkubation der BAC-rTGEV-DNAs erfolgte für 1 h bei 37°C in zwei parallen Ansätzen:

- ClaI
- EcoRI und XhoI

Die Ansätze wurden anschließend elektrophoretisch in einem 0,8%igen TBE-Gel (3.3.3) aufgetrennt und die Bandenmuster wurden mit einer BAC-rTGEV-Standard-Restriktionskarte verglichen.

3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu separieren. Dabei ist die verwendete Konzentration der Agarose im Gel abhängig von den zu identifizierenden DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 bis 2,0 % verwendet. Wurden die DNA-Fragmente z.B.

für eine Ligation nach der Gelelektrophorese benötigt, wurde ein TAE-Gel bei 80 V gefahren und die Banden wurden nach dem Lauf aus dem Gel ausgeschnitten (3.3.4). Wurde die DNA für analytische Zwecke aufgetrennt, wurde ein TBE-Gel benutzt und bei 120 V gefahren. Die DNA-Proben wurden 1:6 mit Ladepuffer verdünnt und je Gellauf wurde ein Größenstandard mit aufgetragen. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte durch Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromidlösung für 5-20 min und anschließender Betrachtung auf einem UV-Tisch.

3.3.6 DNA-Isolierung aus TAE-Agarosegelen

Für präparative Zwecke wurden DNA-Fragmente in einem TAE-Agarosegel separiert. Da die DNA-Fragmente weiter benutzt werden sollten, durften sie nicht mit der DNA-interkalierenden Substanz Ethidiumbromid in Kontakt kommen. Deshalb wurde bei einer präparativen Gelektrophorese die Probe doppelt aufgetragen und nur die Gelhälfte mit dem Größenstandard mit Ethidiumbromid inkubiert. Auf dem UV-Tisch wurde dann mit Hilfe eines Skalpells der Gelbereich, in dem sich die zu präparierende DNA-Bande befand, markiert und auf die nicht mit Ethidiumbromid inkubierte Gelhälfte übertragen. Die DNA-Bande wurde dort mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem Gelextraktions-Kit nach Angaben des Herstellerprotokolls aus dem Gel extrahiert. Die Elution der DNA erfolgte in 30µl DEPC-H_2O.

3.3.7 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Nach der Restriktion eines Plamids ist es möglich, dass es bei der anschließenden Ligation zu einer Religation des Plasmids kommt. Um dies zu verhindern, wurde bei den geschnittenen Plasmiden die Phosphatgruppe am 5`-Ende entfernt. In dieser Arbeit wurde die alkalische Phospatase FastAP verwendet. Der Dephosphorylierungsansatz wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt und bei 37°C für 20 min inkubiert. Um die alkalische Phosphatase zu deaktivieren, wurde der Ansatz für 5 min bei 75°C erhitzt. Um die dephosphorylierten Plasmide von Enzym und Reaktionspuffer zu trennen, wurde eine Umpufferung mit einem PCR-Aufreinigung-Kit durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl DEPC-H_2O.

3.3.8 Ligation

Bei der Ligation wird das 3`-Hydroxy-Ende eines DNA-Moleküls mit dem 5`-Phosphat-Ende eines anderen DNA-Moleküls durch eine Phosphodiesterbindung mit dem Enzym Ligase verknüpft. Für die Ligation eines Plasmids mit einem Insert, wurden die beiden DNA-Moleküle zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten (3.3.4) und der Plasmid-Vektor wurde dephosphoryliert (3.3.7). Für die Ligation wurde die T4-Ligase (aus dem T4-Bakteriophagen) benutzt. Die Tabelle 3-12 zeigt das Pipettierschema des Ligationsansatzes.

Tab. 3-12 Pipettierschema eines Ligationsansatzes *Weiss Unit

Plasmid-DNA (50-100 ng)	x µl
Insert-DNA	x µl (in einem 4:1 molaren Verhältnis zur Plasmid-DNA)
T4-Ligase (5U*/µl)	2 µl
10x T4-Ligase-Puffer	3 µl
DEPC-H_2O	ad 30µl

Als Negativkontrolle, für eine mögliche Religation, wurde der Ansatz wie in Tabelle 3-12 beschrieben angesetzt, aber ohne Insert-DNA (mit dem entsprechenden Volumen an H_20 ausgeglichen). Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.3.9 DNA-Konzentrationsbestimmung

Während der einzelnen Klonierungsschritte oder nach Plasmid-Präparationen war es notwendig die DNA-Konzentration zu bestimmten. Liegt DNA in wässrigen Lösungen vor, kann durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm die DNA-Konzentration ermittelt werden. Dazu wurden die DNA-Lösungen 1:100 oder 1:50 in einer Küvette mit autoklaviertem H_2O verdünnt und gegen einen Blindwert (H_2O) gemessen.

3.3.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit klonierten Plasmide wurde von der Firma GATC Biotech in Konstanz oder von der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg durchgeführt. War das Umschreiben der Sequenzen in die Komplementärsequenz

notwendig, wurde dies mit dem Internet-Programm *Reverse Complement*[1] durchgeführt. Ein Sequenz-Alignment erfolgte mit dem Internet-Programm BLAST[2] (NCBI).

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* XL-1 Blue

Eine Kolonie von *E. coli* XL-1 Blue wurde in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C angeschüttelt. 1 ml dieser Kultur wurde genutzt um 250 ml LB-Medium anzuimpfen. Diese Kultur wurde bei 37 °C für ca. 2-3 h angeschüttelt, bis sie eine OD von 0,5 bei einer Wellenlänge von 595 nm hatte. Die Bakterien wurden pelletiert, in 75 ml TFB resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert, in 10 ml TFB II resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

3.4.2 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli* XL-1 Blue

Um die Plasmid-Vektoren zu vervielfältigen, wurden sie in chemisch-kompetente *E.* coli Bakterien (XL-1 Blue) transformiert. Dazu wurden 50 µl *E. coli* XL-1 Blue Aliquots (bei -80°C gelagert) auf Eis aufgetaut und mit 2 µl aus einem Ligationsansatz oder 1 µl aus einer Plasmidpräparation versehen. Es erfolgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis und ein anschließender Hitzeschock für 30 sec in einem 42°C-warmen Wasserbad. Die Transformationsansätze wurden für weitere 2 min auf Eis inkubiert und dann mit 250 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgefüllt und für 1 h bei 37°C angeschüttelt. 50 µl der Ansätze wurden auf LB-Medium-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Wurde ein etabliertes Plasmid transformiert, dienten die angewachsenen Kolonien direkt zur Animpfung für eine Plasmidpräparation (3.4.2). Handelte es sich um ein neukloniertes Plasmid wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um eine erfolgreiche Ligation bzw. Klonierung zu überprüfen (3.3.1.3).

---

[1] http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (2014-02-20)

[2] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq (2014-02-20)

3.4.3 DNA-Präparationen

3.4.3.1 Mini-Präparation

Standen nach der Kolonie-PCR (3.3.1.3) positive Klone zur Verfügung wurden ein bis drei Klone in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 %) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Mini-Präparation. Die DNA wurde in 30 µl DEPC-H_2O eluiert, die DNA-Konzentration bestimmt und zur Sequenzierung geschickt (3.3.10). Parallel zur Sequenzierung erfolgte eine Immunfluoreszenzanalyse (3.6.1) der eingesendeten Klone.

3.4.3.2 Midi-Präparation

Etablierte Plasmide wurden zur Vermehrung in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 %) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Midi-Präparation und die DNA wurde in 100 µl über Nacht bei 4°C in DEPC-H_2O resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde bestimmt und Aliquots mit DNA-Konzentrationen von 1-2 µg/µl wurden hergestellt. Die präparierte DNA wurde vor ihrer Verwendung auf ihre Identität in einer Immunfluoreszenzanalyse (3.6.1) getestet.

3.4.3.3 BAC-Präparation

Für die BAC-Präparation wurde ein Dreiösenausstrich von BAC-rTGEV-Glycerin-Stocks auf einer LB-Medium-Agarplatte mit Chloramphenicol (16µg/µl) gemacht und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie gepickt und in einer Vorkultur mit 5 ml LB-Medium mit Chloromamphenicol (16µg/µl) für 6 h bei 30 °C angeschüttelt. 1,5 ml dieser Vorkultur wurde in je einen von drei Schikane-Kolben mit 300 ml LB-Medium und Chloramphenicol überführt und über Nacht bei 30 °C angeschüttelt. Pro 300 ml-Bakterienkultur wurde eine BAC-Präparation mit Hilfe des Kits *NucleoBond BAC100 Kit* laut Herstellerangaben durchgeführt. Das DNA-Pellett wurde über Nacht in 100 µl DEPC-H_2O gelöst und es wurde ein Restriktionsverdau (3.3.4) zur Identitätsprüfung durchgeführt.

3.5 Heterologe Expression in eukaryotischen Zellsystemen

3.5.1 Transfektion mit PEI (Polyethylenimine)

Für die Herstellung der PEI-Gebrauchslösung wird das Polyethlen-Pulver in dest. H_2O mit einer Konzentration von 1µg/µl eingewogen. Zum Lösen des PEI wird 37%-ige HCl zugegeben, der pH-Wert wird auf 2,0 eingestellt und für 2-3 h gerührt. Danach wird die PEI-Lösung mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und steril filtriert. Die PEI-Gebrauchslösung kann nun aliquotiert werden und bei -80°C gelagert werden. Nach dem Auftauen ist die PEI-Lösung 1-2 Monate haltbar und sollte während dieser Zeit bei 4°C gelagert werden.

Tab. 3-13 Übersicht der Transfektion mit PEI

	6-*well*-Platten	**10cm-Schalen**
Vorgelegtes Medium in *well*/Schale	2 ml	7 ml
Volumen Opti-MEM	1 ml	3 ml
Plasmid-DNA	4 µg	12 µg
PEI	6 µl	20 µl

BHK 21-Zellen wurden einen Tag zuvor ausgesät (3.1.2), so dass die Zellen am Tag der Transfektion eine 70-80%ige Konfluenz zeigten. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und neues EMEM mit 3 %-FKS wurde auf die Zellen pipettiert. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in das entsprechende Volumen Opti-MEM pipettiert und für 5 min bei RT inkubier. Danach wurde die PEI-Gebrauchs-Lösung unter leichtem Schwenken des Reaktionsgefäß zugegeben (Tab. 3-13). Das Transfektionsgemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert und dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

3.5.2 Transfektion mit Lipofectamine

Die Transfektion mit dem Lipofectamine 2000 Reagenz erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich für die Immunfluoreszenzanalysen (3.6.1). Die Aussaat der Zellen in 24-*well*-Platten (3.1.2) erfolgte einen Tag vor Transfektion. Es wurden Zellen transfiziert die eine Konfluenz von 70-90 % aufwiesen. Die Durchführung der Transfektion er-

folgte nach Angaben des Herstellerprotokolls. Pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte wurde eine DNA-Gesamtmenge von 2 µg transfiziert.

3.6 Methoden zum Proteinnachweis (nicht-radioaktive Arbeiten)

3.6.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurde in dieser Arbeit genutzt, um Proteine intrazellulär und auf der Zelloberfläche zu detektieren.

Für die Immunfluoreszenzanalye wurden BHK 21-Zellen in 24-well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und einen Tag später mit Lipofectamine transfiziert (3.5.2). Das Transfektionsverhältnis S-Protein cDNA bzw. GGS cDNA zu M-Protein cDNA war stets 5:1. Das Verhältnis von M-Protein cDNA zu E-Protein cDNA war 2:1. Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über das Transfektionsschema der S-M-Proteininteraktions-IFA (Tab. 3-14) und der VLP-IFA (Tab. 3-15).

Tab. 3-14 Übersicht über die transfizierten DNA-Mengen pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte der S-M-Proteininteraktions-IFA

	Plasmid-DNAs [µg/*well*]			
Expression	**S**	**GGS**	**MHA**	**pCGI**
S + p	1,6	---	---	0,4
S + MHA	1,6	---	0,4	---
GGS + p	---	1,6	---	0,4
GGS + MHA	---	1,6	0,4	---

Tab. 3-15 Übersicht über die transfizierten DNA-Mengen pro Vertiefung einer 24-*well*-Platte der VLP-IFA

	Plasmid-DNAs [µg/*well*]				
Expression	**S**	**GGS**	**MHA**	**E**	**pCGI**
S + p	1,6	---	---	---	0,4
S + M + E	1,6	---	0,4	0,4	---
GGS + p	---	1,6	---	---	0,4
GGS + M + E	---	1,6	0,4	0,4	---

Die Zellen wurden einen Tag nach Transfektion dreimal mit PBS gewaschen und mit 3%iger PFA-Lösung für 20 min fixiert. Nach der Fixierug wurde dreimal mit PBS gewaschen, es erfolgte eine 5 min Inkubation mit einer 0,1 molaren Glycin/PBS-Lösung und ein dreimaliger PBS-Waschschritt. Für das Eindringen der Antikörper wurden die Membran der Zellen mit 0,2%iger Triton X-100/PBS-Lösung für 5 min permeabilisiert. Es schloss sich ein dreimaliger Waschschritt an. Die Inkubation der Antikörper erfolgte in Glaspetrischalen, in denen auf einem feuchten Tuch ein Parafilm ausgebreitet war auf dem je 30 µl Antikörper-Lösung pipettiert wurden. In der Tabelle 3-16 ist eine Übersicht der verwendeten Antikörper dargestellt. Die Deckgläschen aus den 24-well-Platten wurden mit einer Kanüle und einer Pipette mit der Zellrasenseite auf die Tropfen platziert und je nach Antikörper für 45 min (2. AK) bis 1 h (1. AK) im Dunkeln inkubiert. Um die ungebundenen Antikörper von den Zellen zu entfernen, wurde dreimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem nächsten Antikörper. Wenn alle Antikörper-Behandlungen abgeschlossen waren, wurde abschließend wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Kern-Färbung mit 250µl DAPI-Lösung pro *well* erfolgte für 20 min bei 37°C. Die DAPI-Lösung wurde abgenommen und es wurde dreimal mit dest. H_2O gewaschen. Die Deckgläschen wurden abschließend mit Mowiol auf Objektträgern eingedeckt.

Tab. 3-16 Übersicht der verwendeten Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse (IFA)

Protein / Epitop	1. AK / Verdünnung		2. AK / Verdünnung	
TGEV S (6A.C3)	α-TGEV S	1:200	α-Maus-Cy3	1:300
TGEV M (9D.B4)	α-TGEV M	1:200	α-Maus-Cy3	1:300
HA-Peptid	α-HA	1:200	α-Kaninchen-FITC	1:300
VSV G	α-VSV G	1:200	α-Maus-Cy3	1:300

Die Auswertung der Kolokalisationsversuche erfolgte an dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 mit einem 63x Öl-Immersions-Objektiv. Die übrigen Immunfluoreszenzanalysen wurden an dem Nikon Eclipse Ti mit einem 100x Öl-Immersions-Objektiv aufgenommen. Die Bildbearbeitung (Helligkeit und Kontrast) und das Überlagern der Aufnahmen mit den DAPI-Bildern erfolgten mit der Software Adobe PhotoShop unter Berücksichtigung von gleichen Einstellungen bei allen Aufnahmen einheitlich.

3.6.2 Glykosylierungs-Muster

Für die Bestimmung des Glykosylierungs-Musters der unterschiedlichen TGEV S-Mutanten in Einzelexpression oder in Koexpression mit dem TGEV M-Protein wurden BHK 21-Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät (3.1.2) und am darauffolgenden Tag mit PEI (3.5.1) nach dem Schema in Tabelle 3-17 transfiziert.

Tab. 3-17 Übersicht des Transfektionsschemas (Glykosylierungs-Muster)

	Plasmid-DNAs [µg/*well*]		
Expression	**S**	**M**	**pCGI**
S + p	3,2	---	0,8
S + M	3,2	0,8	---

Einen Tag nach Transfektion erfolgte eine Zelllyse (3.6.3). Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE (3.6.6) separiert und im Westernblot (3.6.7) analysiert.

3.6.3 Zelllyse mit Nonidet P-40

Die Zelllyse der BHK 21-Zellen erfolgte auf Eis. Dazu wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen wurden in 1 ml PBS abgeschabt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden bei 3700 x g und bei 4 °C für 5 min pelletiert. Der Überstand der Zellen wurde mit einer Pipette sorgfältig abgenommen. Die Zellen einer 10cm-Schalen wurden in 250 µl, die Zellen eines 6-*wells* in 100µl NP40-Lysispuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Für die Koimmunpräzipitation von S- und M-Protein wurde ein NP40-Lysispuffer ohne Natrium-Desoxycholat verwendet. Nach der Zelllyse wurden die Lysate für 30 min bei 4°C und 20000x g zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Wurden die Lysate nicht sofort verwendet wurden sie bei -18°C gelagert.

3.6.4 Koimmunpräzipitation (Ko-IP) mit Protein A-Sepharose

Für die Komimmunpräzipitation (Ko-IP) von S- und M-Protein wurden BHK 21-Zellen in 6-*well*-Platten ausgesät (3.1.2) und am darauffolgenden Tag mit PEI (3.5.1) nach dem Schema in Tabelle 3-18 transfiziert.

Tab. 3-18 Übersicht des Transfektionsschemas (Koimmunpräzipitation)

	Plasmid-DNAs [µg/*well*]		
Expression	**S**	**M**	**pCGI**
S + p	1,6	---	0,4
S + MHA	1,6	0,4	---

Einen Tag nach Transfektion erfolgte eine Zelllyse mit NP40-Lysispuffer ohne Natrium-Desoxycholat (3.6.3). Die Lysate wurden auf 50µl Protein A-Sepharose (PAS) mit 2 µl α-TGEV S (aus Maus) pipettiert und mit 350 µl NP40-Lysispuffer ohne Natrium-Desoxycholat aufgefüllt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschwenker immunpräzipitiert. Am darauffolgenden Tag wurden die PAS dreimal mit NP40-Lysispuffer ohne Na-Desoxycholat und ohne Proteinaseinhibitoren (Complete) gewaschen (je 3 min, bei 20000x g, 4°C). Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand abgenommen, 50µl 2xSDS-Probenpuffer wurde dazugeben und für 10 min bei 96°C erhitzt. Danach wurden die Sepharose von den Proteine durch Zentri-

fugation bei 20000xg für 5 min getrennt, und die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt. Mittels SDS-PAGE (3.6.6) wurden die Proben separiert und im Westernblot (3.6.7) mit α-HA (aus Kaninchen) analysiert.

3.6.5 Virusähnliche Partikel (VLP)-Assay

Für den Nachweis von virusähnlichen Partikeln in den Zellkulturüberständen von transfizierten Zellen wurden BHK 21-Zellen in 10cm-Schalen ausgesät (3.1.2) und mit PEI (3.5.1) nach der folgenden Tabelle (Tab. 3-19) transfiziert.

Tab. 3-19 Transfektionsschema des VLP-Assays

	Plasmid-DNAs [µg/*well*]			
Expression	**S**	**M**	**E**	**pCGI**
S + p	12	---	---	12
S + M + E	12	6	6	---

Einen Tag nach Transfektion wurden die Überstände der Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2800 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Die 10cm-Schalen wurden währenddessen auf Eis platziert. Es wurde eine 25%ige-Saccharose-Lösung in PBSM angesetzt. 6 ml der Zellkulturüberstände wurde in Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 0,5 ml der Saccharose-Lösung unterschichtet. Der Rest der Zellkulturüberstände wurde ebenfalls vorsichtig in die Zentrifugenröhrchen pipettiert und gegebenfalls mit Medium zum Austarieren aufgefüllt. Die Ultrazentrifugatin erfolgte in einem SW41-Rotor für 1 h, bei 35.000 rpm und bei 4°C. Nach dem Ultrazentrifugenlauf wurden die Zentrifugeröhrchen wieder auf Eis platziert, und die Überstände wurden vorsichtig abgenommen. Die pelletierten VLPs wurde in 50 µl 2xSDS-Laufpuffer resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt.

Parallel zum Ultrazentrifugationsschritt erfolgte die Lyse der Zellen zum Expressionsnachweis der S- und M-Proteine. Dazu wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, und abgeschabt und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Lyse erfolgte wie unter 3.6.3 beschrieben mit 250µl NP40-Lysispuffer.

Die Überstandsproben und Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE (3.6.6) separiert und im Westernblot (3.6.7) analysiert.

3.6.6 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine analytische Methode um Proteine ihrer Größe nach zu separieren (Lämmli, 1970). Die Gele in dieser Arbeit wurden selbstgegossen. Die Trenngele wurden für den Nachweis des S-Proteins mit einer Acrylamid-Konzentration von 8 % und für den Nachweis des M-Proteins mit einer 10%-igen Konzentration verwendet. Die SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

Die Lysatproben wurden, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden, für 5 min bei 96°C gekocht. Die Überstandsproben des VLP-Nachweises wurden nicht erhitzt. Der Einlauf der Proben ins Sammelgel erfolgte bei 50 V, die Separation im Trenngel bei 120 V. Bei jedem Gellauf wurden Proteingrößenstandards mitgeführt, die 1:10 in 2xSDS-Probenpuffer verdünnt wurden. Die Proteine wurden nach dem Gellauf mittels *Semi-dry*-Blot (3.6.7) auf eine Nitrozellulosemembran überführt.

3.6.7 Westernblot (*Semi-dry* Technik)

Mittels *Semi-dry*-Blot wurden die Proteine aus dem SDS-PAGE-Trenngel (3.6.6) auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Anordnung der Filterpapiere, der Membran und des Trenngels in der Transferkammer ist in Abbildung 3-4 zu sehen.

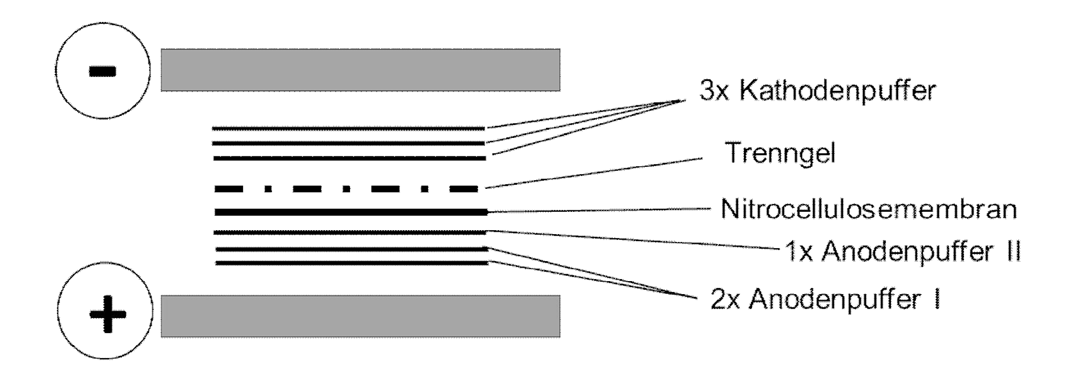


Abb. 3-4 Aufbau des Semi-dry Blots

Der Transfer der S-Proteine erfolgte für 45 min bei 350 mA (Kammer Biorad). Die M-Proteine wurden für 20 min bei 300 mA (Kammer Biometra) transferiert. Für das Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran wurde diese über Nacht in Blocking-Reagenz bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Membranen dreimal für 8 min mit PBSM+0,1%Tween und einmal für 8 min mit PBSM gewaschen. Die Tabelle 3-20 gibt eine Übersicht der verwendeten Antikörper und ihrer eingesetzten Verdünnungen.

Tab. 3-20 Übersicht der Proteindetektion in der Westernblotanalyse. Die Verdünnungen der Antikörper/Substrate erfolgten in PBSM.

Protein / Epitop	1. AK	2. AK	3.
TGEV S	α-TGEV S (1:200)	α-Maus POD (1:1000)	---
TGEV M	α-TGEV M (1:200)	α-Maus POD (1:1000)	---
TGEV MHA	α-HA (1:200)	α-Kaninchen POD (1:1000)	---
TGEV S in den Überständen des VLP-Assays	α-TGEV S (1:200)	α-Maus Biotin (1:1000)	Streptavidin-POD (1:1000)

Die Erstantikörper (1. AK) wurden je für 1 h, die Zweitantikörper (2. AK) je für 45 min bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach der Antikörper-Inkubation wurden die Membranen mit dem Substrat Super Signal Dura für 5 min behandelt. Die an die Zweitantikörper gebundene Peroxidase katalysiert die Umsetzung des Substrates, wobei die entstehende Chemilumineszenz mit Hilfe des Chemi Doc Systems detektiert wurde.

3.7 Radioaktive Arbeiten

3.7.1 Metabolische Markierung mit ^{35}S-Met/Cys und ^{3}H-Palmitinsäure

3.7.1.1 Markierung von transfizierten Zellen für Palmitoylierungs-Nachweise

BHK 21-Zellen wurden in 6-*well*-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit Lipofectamine transfiziert (3.5.2). Die Transfektionen erfolgten im Doppelansatz, so dass je ein 6-well entweder mit ^{35}S-Met/Cys oder ^{3}H-Palmitinsäure markiert werden konnte. Für die Markierungen zum Ort der Palmitoylierung (Ergebnisse 4.1.2) wurde 5h p.t. mit ^{35}S-Met/Cys und ^{3}H-Palmitinsäure für 19 h markiert. Die Markierungen der unterschiedlichen Cystein-Mutanten (Ergebnisse 4.1.3) erfolgte 20 h p.t. für 6 h. Anschließend erfolgte eine Zelllyse (3.6.3) und eine Immunpräzipitation der S-Proteine mit α-TGEV S-Antikörper mit 50µl Protein A-Sepharose über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschwenker. Am nächsten Tag wurde die Sepharose zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine dreimal mit NP40-Lysispuffer (ohne Complete) gewaschen (3 min, 20000x g). Nach dem letzten Waschschritt wurden die Überstände abgenommen und 50 µl 2xSDS-Probenpuffer auf die Sepharose pipettiert. Durch 5 minütiges erhitzen bei 96°C wurden die Proteine von der Sepharose gelöst und die Sepharose wurde abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und in einer SDS-PAGE (3.6.6) aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mittels Fluographie (3.7.6) sichtbar gemacht.

3.7.1.2 Markierung transfizierter Zellen für die Saccharose-Gradienten

BHK 21-Zellen wurden in 10cm-Schalen ausgesät und am darauffolgenden Tag wie unter 3.5.1 beschrieben mit PEI transfiziert. Es wurden je vier Schalen mit TGEV Swt-cNDA, TGEV $S_C_{1\text{-}10}$A oder leerem pCGI-Vektor (mock) transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und mit 7 ml Mangelmedium (ohne Methionin/Cystein) pro Schale ersetzt. Die Zellen wurden für 2 h ausgehungert und das Medium wurde vor der Markierung abgesaugt. Die Markierung erfolgte mit 100µCi ^{35}S-Met/Cys in 4 ml Mangelmedium pro Schale für 6 h bei 37°C. Danach wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, und die Zellen wurden in den 10cm-Schalen eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen aufgetaut und für die Saccharose-Gradienten präpariert (3.7.3).

3.7.2 Isolation von radioaktiv markierten Viruspartikeln

Für die Markierung von TGEV-Partikeln wurden ST-Zellen in 15cm-Schalen ausgesät (3.1.2) und einen Tag danach mit TGEV (3.2.1) infiziert bzw. mock-infiziert als Negativkontrolle. 1 h p.i. wurden die Zellen gewaschen und mit Mangelmedium für 2 h inkubiert. 3 h p. i. wurde die Zellen mit 20 µCi/ml markiert, wobei je eine Schale der beiden Ansätze mit ^{35}S-Met/Cys oder ^{3}H-Palmitinsäure markiert wurde. Die Markierung mit ^{3}H-Palmitinsäure diente zum Nachweis des acylierten S-Proteins in den Viruspartikeln. Die Markierung mit ^{35}S-Met/Cys diente zur Expressionskontrolle der viralen Proteine. Nach 21 h Markierung wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, und die Viruspartikel wurden bei 100 000 x g für 2 h in einem SW 28m-Rotor pelletiert. Die Viruspeletts wurden in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und per SDS-PAGE separiert (3.6.6). Die Detektion der markierten Proteinbanden erfolgte mittels Fluographie (3.7.6).

3.7.3 Saccharose-Gradienten

3.7.3.1 Zelllyse

Die unter 3.7.1.2 transfizierten und markierten Zellen wurden aufgetaut und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen einer Schale wurden in 1 ml PBS abgeschabt, in Reaktionsgefäße überführt und auf Eis platziert. Durch Zentrifugation (5 min, 3700 x g, 4°C) wurden die Zellen pelletiert und in 250 µl Gradienten-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle (G21 x 1,5‘‘) wurden die Zelllysate homogenisiert und für 3 h bei 4°C auf einem Überkopfschwenker in Gradienten-Lysis-Puffer lysiert. Für einen Saccharose-Gradienten wurden die Zelllysate aus vier 10cm-Schalen gepoolt und auf die Gradienten pipettiert (3.7.3.2).

3.7.3.2 Herstellung der Saccharose-Gradienten

Für das Auftrennen der Zelllysate (3.7.3.1) wurden kontinuierliche Saccharose-Gradienten mit Hilfe einer Gradienten-Gießmaschine bei 10x Geschwindigkeit gegossen. Die Abbildung 3-5 zeigt den Aufbau der verwendeten Gradienten.

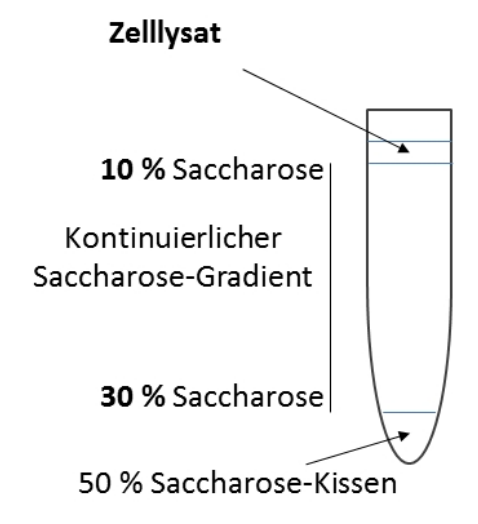


Abb. 3-5 Übersicht des kontinuierlichen Saccharose-Gradienten

Die Saccharose-Lösungen für die Gradienten wurden in Gradienten-Lyis-Puffer angesetzt und auf Eis gekühlt gelagert. Die Gradienten wurden in Ultrazentrifugenröhrchen gegossen, wobei sich ein 50%-iges Saccharose-Kissen am Boden des Röhrchens befand und der Gradient zur Öffnung des Röhrchens an Saccharose-Konzentration (30-10%) abnahm. Die Zelllysate wurden auf den Gradienten pipettiert. Die Gradienten wurden über Nacht für 18 h bei 35000 rpm in einem SW 40 Ti Rotor bei 4°C ultrazentrifugiert.

3.7.3.3 Ernten von Saccharose-Gradienten

Nach der Ultrazentrifugation wurden die Saccharose-Gradienten geerntet. Dazu wurden mit Hilfe der Gießmaschine 700 µl Fraktionen vom Boden der Zentrifugenröhrchen geerntet und in Reaktionsgefäßen, in denen sich 50 µl Protein A-Sepharose mit α-TGEV S-Antikörper befanden, gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit gleichem Volumen an NP40-Lysispuffer aufgefüllt und über Nacht bei 4°C mit Hilfe eines Überkopfschwenkers immunpräzipitiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Fraktionen dreimal mit NP40-Lysispuffer (ohne Complete) für 3 min bei 20000x g gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand vollständig abgenommen und 50 µl 2x SDS-Probenpuffer wurde auf die Protein A-Sepharose gegeben. Durch Erhitzen bei 96°C für 5 min wurden die Sepharose von den Proteinen gelöst und konnte durch Zentrifugation (5 min, 20000x g) abzentrifugiert werden. Die Überstände wurden in neue Reaktiosgefäße überführt und mittels SDS-PAGE (3.7.4)

aufgetrennt. Die markierten Proteinbanden wurden mittels Phosphor-Imaging (3.7.5) visualisiert.

3.7.4 SDS-PAGE

Die radioaktivmarkierten Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert. Die selbstgegossenen Trenngele wurden für den Nachweis des S-Proteins mit einer Acrylamid-Konzentration von 6 % verwendet. Die SDS-PAGE wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Je 50 µl der Fraktionen wurden pro Gel-Tasche aufgetragen und bei konstanter Stromstärke (10 mA/Gel) über Nacht laufen gelassen. Ein Proteingrößenstandard wurde ebenfalls mit aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Phospo-Imaging (3.7.5).

3.7.5 Phosphorimaging

Die SDS-Gele der Saccharose-Gradienten Fraktionen wurden nach einer Fixierung mit Essigsäure auf Filterpapier übertragen und mit Hilfe eines Geltrockners unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Danach wurden die getrockneten Gele auf einen Screen gelegt, der für drei Tage belichtet wurde. Die Auswertung der Screens erfolgte mit einem Molecular Imager FX.

3.7.6 Fluorographie

Die markierten TGEV S-Mutanten aus Kapitel 3.7.1.1 wurden nach SDS-PAGE durch Fluorographie sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel nach dem Lauf über Nacht bei Raumtemperatur in 10% Essigsäure/10% Ethanol in H_2O fixiert. Danach wurde das Gel für 15 min in H_2O gewaschen und mit 1 M Natriumsalicylat (pH 7,4) für 30 min inkubiert. Das Gel wurde getrocknet, auf einen hochsensitiven Röntgenfilm gelegt und für 1-30 Tage, je nach Markierung, exponiert. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte bei -80°C, um den Hintergrund auf dem Film zu reduzieren. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.7.7 Hydroxylamin-Behandlung

Hydroxylamin ist ein reduzierendes Agenz und wurde in dieser Arbeit benutzt, um das Vorhandensein einer Thioesterverbindung in der Palmitatmarkierung nachzuweisen. Dazu wurden die getrocknete Gele (3.7.6) wieder rehydriert. Die Gele wurden in H_2O gelegt und vom Filterpapier getrennt. Die Gele wurden über Nacht in 1 M Hydroxylamin (pH 7,0 in H_2O) inkubiert. Der pH-Wert der Hydroxylamin-Lösung spielt dabei eine wichtige Rolle. Bei pH 7 kann das Hydroxylamin Thio-Esterbindungen (S-Acylierung) abspalten, aber keine Amid-Bindungen (Myristylierung). So ist es möglich zu unterscheiden, ob die Fettsäure als S-Acylierung oder als N-Myristylierung in ein Protein eingebaut wurde. Nach der Hydroxylamin-Behandlung wurde je zweimal für 30 min mit H_2O, DMSO und abschließend wieder mit H_2O gewaschen. Die Behandlung mit DMSO diente dazu, die nicht wasserlöslichen, abgespaltenen Fettsäuren aus dem Gel zu waschen. Danach wurde das Gel für 15 min in H_2O gewaschen und mit 1 M Natriumsalicylat (Szintillator) für 30 min inkubiert und getrocknet. Die Gele wurden auf einen hochsensitiven Röntgenfilm gelegt und für 1-30 Tage bei -80°C exponiert. Die Hydroxylamin-Behandlung erfolgte parallel für die ^{35}S-Met/Cys- und ^{3}H-Palmitinsäure-Markierungen.

3.8 Elektronenmikroskopie (Negativkontrastierung)

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden in dieser Arbeit virusähnliche Partikel auf ihr Vorhandensein von S-Proteinen untersucht und mit authentischen TGE-Viruspartikeln verglichen. Dazu wurde ein VLP-Assay wie in 3.6.5 beschrieben durchgeführt. Die pelletierten VLPs wurden hierbei jedoch nicht in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen sondern in PBS und für die Elektronenmikroskopie präpariert. Dazu wurden die Proben für 20 min auf einem Netzchen (*grid*) mit einer Maschengröße von 200 mesh inkubiert. Danach wurden die Netzchen zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Netzchen mit einer Pinzette auf je zwei Tropfen PBS gelegt und für ca. 20 sec dort liegen gelassen. Das überschüssige PBS wurde mit Filterpapier abgesaugt. Abschließend wurden die Netzchen mit Kontrastmittel (2% Phosphorwolframsäure in dest. H_2O) inkubiert und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Positivkontrolle mit TGEV hatte einen Titer von $3{,}5 \times 10^7$ PFU/ml. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei 10 000 x Vergrößerung aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Palmitoylierung des TGEV Spike-Proteins

4.1.1 Das TGEV S-Protein liegt in palmitoylierter Form in Viruspartikeln vor

Viele Virale Proteine werden palmitoyliert, u.a. auch das MHV und SARS-CoV S-Protein (McBride and Machamer, 2010; Petit et al., 2007; Thorp et al., 2006; Shulla und Gallagher, 2009). Diese beiden coronaviralen S-Proteine enthalten wie auch das TGEV S-Protein ein cysteinreiches Motiv (CRM) in der zytoplasmatischen Domäne. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch das TGEV S-Protein einer solchen Palmitoylierung unterzogen wird.

Um dieser Fragestellung nachzukommen wurden mit TGEV infizierte bzw. nicht infizierte (mock) ST-Zellen mit ^{35}S-Methionin/Cystein bzw. mit ^{3}H-Palmitinsäure markiert. ST-Zellen (engl. *Swine testicular*) sind porcine Hodenzellen. Sie exprimieren porcine Aminopeptidase N (pAPN), die von TGEV als zellulärer Rezeptor genutzt wird und können somit als Wirtszellen zur Virusvermehrung herangezogen werden. Die markierten Viruspartikel wurden aus den Zellkulturüberständen per Ultrazentrifugation pelletiert in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert (s. Kapitel 3.7.2).

Bei der Markierung der TGEV infizierten ST-Zellen mit ^{35}S-Methionin/Cystein zeigte sich bereits nach einem Tag Exposition des Filmes eine Bande mit einer molekularen Masse von ca. 250 kDa (Abb. 4-1, Bild A). Diese Bande entsprach dem TGEV S-Protein, da in der mock-Spur (nicht infizierte Zellen) keine entsprechende Bande zu sehen war. Da die Markierung mit ^{3}H-Palmitinsäure ein wesentlich schwächeres Signal aufweist, als eine Markierung mit ^{35}S-Methionin/Cystein zeigte sich hier erst nach einer Expositionszeit von 4 Wochen eine markierte Bande, die ebenfalls auf einer Höhe von ca. 250 kDa lokalisiert war und dem TGEV S-Protein entsprach (Abb. 4-1, Bild B).

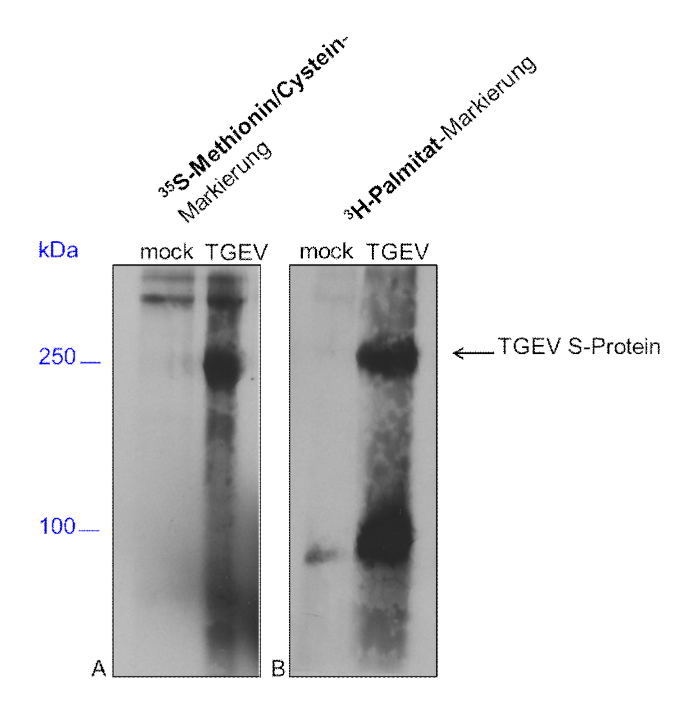


Abb. 4-1 Fluogramme der pelletierten Zellkulturüberstände TGEV infizierter bzw. nicht infizierter (mock) Zellen.
^{35}S-Methionin/Cystein-Markierung (Bild A) und ^{3}H-Palmitat-Markierung (Bild B). Expositionszeit ^{35}S-Methionin/Cystein-Fluogramm: 1 Tag. Expositionszeit ^{3}H-Palmitat-Fluogramm: 4 Wochen.

Eine zusätzliche Bande bei der ^{3}H-Palmitinsäure-Markierung war auf Höhe von knapp 100 kDa zu erkennen. Dies entsprach aber höchstwahrscheinlich keinem viralen Protein, sondern einem zellulären Protein, da die Bande auch in der mock-Spur zu sehen war (Abb 4-1, Bild B).

Um zu bestätigen, dass es sich bei der Markierung um eine tatsächliche S-Acylierung (Palmityolierung) oder um eine N-Myristylierung handelte, wurden die Gele mit dem reduzierenden Reagenz Hydroxylamin behandelt. Hydroxylamin besitzt die Fähigkeit Thioesterverbindungen zu spalten (Abb. 4-2). Bei einer S-Acylierung eines Proteins wird eine Palmitinsäure durch eine Thioesterverbindung an das Schwefelatom einer Cysteinseitenkette geknüpft, bei einer N-Myristylierung werden die Fettsäuren jedoch durch eine Amid-Bindung angeknüpft. Das Hydroxylamin besitzt die Fähigkeit bei einem neutralen pH-Wert Thioesterverbindungen zu spalten, jedoch keine Amid-Bindungen. Hat also eine tatsächliche Palmitoylierung des TGEV S-Proteins stattgefunden, so würde die TGEV S-Proteinbande nach der Hydroxylaminbehandlung nicht mehr sichtbar sein.

Abb. 4-2 Reaktionsschema der Thioesterspaltung durch Hydroxylamin (NH_2OH).

In der Abb. 4-3 ist in Bild B eine ^{3}H-Palmitat-markierte TGEV S-Proteinbande zu sehen. Nach der Behandlung mit Hydroxylamin (s. Kapitel 3.7.7) ist diese Bande nicht mehr detektierbar gewesen (Abb. 4-3, Bild D). Somit war es in diesen Experimenten tatsächlich möglich eine S-Acylierung des TGEV S-Proteins nachzuweisen.

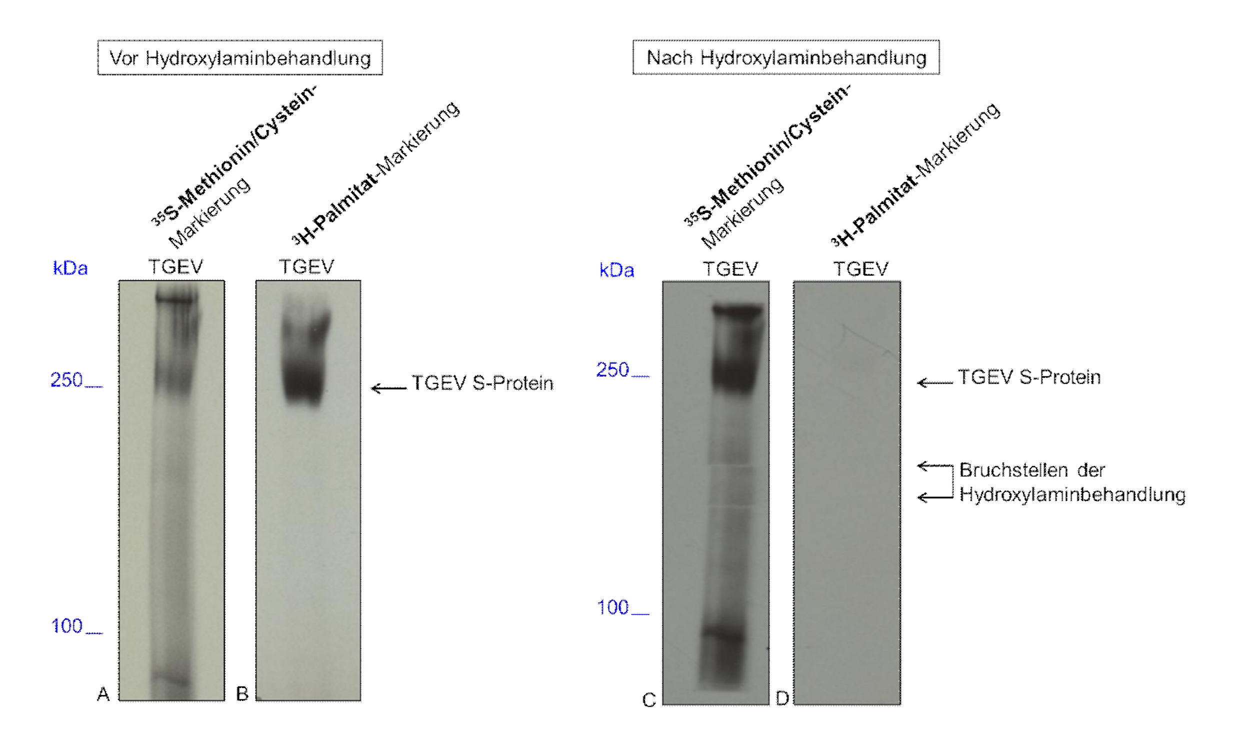


Abb. 4-3 Fluorogramme der ^{35}S-Methionin/Cystein bzw. ^{3}H-Palmitat markierten TGE-Viruspartikel vor (Bild A und B) bzw. nach (Bild C und D) Hydroxylaminbehandlung. Expositionszeit ^{35}S-Methionin/Cystein-Fluogramme: 1 Tag. Expositionszeit ^{3}H-Palmitat - Fluogramme: 7 Tage.

4.1.2 Die Palmitoylierung des TGEV S-Proteins findet in einem prä-Golgi-Kompartiment statt

Der intrazelluläre Transport von membranassozierten Proteinen erfolgt über den sekretorischen Transportweg. Innerhalb dieses Weges werden die Proteine translatiert, gefaltet, modifiziert und durch das ER (Endoplasmatische Retikulum), das ERGIC (ER-Golgi-Intermediäres-Kompartiment) und den Golgi-Apparat bis zur Zellmembran transportiert. Für viele virale Membranproteine, u.a. für die Glykoproteine des Vesikulären Stomatitis Virus und des Sindbis Virus, konnte gezeigt werden, dass diese vor dem Erwerb der Endo H-Resistenz S-acyliert werden (Berger und Schmidt, 1985; Bonatti et al., 1989). Glykoproteine erwerben ihre Endo H-Resistenz durch die Verknüpfung komplexer Zuckerketten im Golgi-Apparat.

Der Zusammenbau von Coronaviruspartikeln erfolgt im ERGIC. In dem folgenden Experiment sollte gezeigt werden, ob die S-Acylierung des TGEV S-Proteins auch bereits in einem prä-Golgi-Apparat Kompartiment erfolgt und ob sie somit einen Einfluss auf den Zusammenbau neuer Viruspartikel haben kann.

Dazu wurden BHK 21-Zellen in 6-*well*-Platten mit codierenden cDNAs für die in Abb. 4-4 dargestellten TGEV S-Proteinkonstrukte transfiziert (s. Kapitel 3.5.2). Das S-Wildtypprotein (Swt) besitzt ein intaktes Tyrosin-basiertes Retentionssignal und wird somit im ERGIC, dem Ort des Zusammenbaus von TGE-Viruspartikeln, zurückgehalten. Wird dieses Retentionssignal durch die Substitution des Tyrosins durch ein Alanin zerstört, wird diese S_Y/A-Mutante nicht mehr intrazellulär zurückgehalten und wird zur Plasmamembran transportiert. Das Protein durchwandert somit den kompletten sekretorischen Weg (ER, ERGIC, Golgi-Apparat). Das Swt-Protein und die S_Y/A-Mutante wurden in diesem Experiment ausgewählt um zu untersuchen, in welchem intrazellulären Kompartiment die Palmitoylierung des TGEV S-Proteins erfolgt. Außerdem wurden die TGEV S-Cysteinmutanten $S_C_{1-10}A$ und $S_C_{1-10}A_Y/A$ (Abb. 4-4) untersucht, um zeigen zu können, dass eine vollständige Substitution aller Cysteinreste im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins, die Palmitoylierung in den unterschiedlichen zellulären Kompartimenten verhindert.

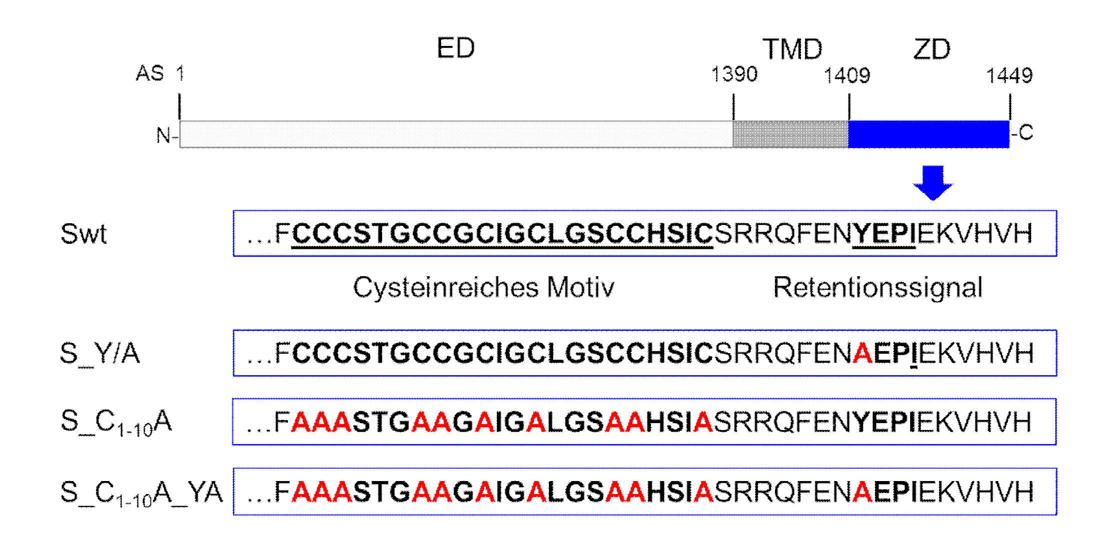


Abb. 4-4 Schematische Darstellung des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV S-Cys-Mutanten.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Die transfizierten Zellen wurden mit ^{3}H-Palmitat zum Nachweis der S-Acylierung bzw. mit ^{35}S-Methionin/Cystein zur Expressionskontrolle markiert. Es erfolgte eine Lyse der Zellen und eine IP mit dem monoklonalen Antikörper (mAK) 6A.C3 gegen das TGEV S-Protein mit anschließender Separation in einer SDS-PAGE und Detektion mittels Fluorographie (s. Kapitel 3.7.1.1).

Die Markierung mit ^{35}S-Methionin/Cystein (Abb. 4-5, Bild B) zeigte, dass das Swt-Protein und die unterschiedlichen S-Proteinmutanten in den Zellen exprimiert wurden. Das TGEV S-Protein zeigte sowohl für die Proteine mit intaktem als auch für die Mutanten ohne intaktes Retentionssignal (Y/A-Mutation) Doppelbanden (Höhen ca. 250 und 220 kDa) in den Zelllysaten. Außerdem zeigte sich eine unspezifische Bande knapp unterhalb der 250 kDa-Bande in der Spur der mock-transfizierten Zellen. Eine Markierung mit ^{3}H-Palmitat (Abb. 4-5, Bild A) war ausschließlich bei dem authentischen TGEV S-Protein und der S_Y/A-Mutante möglich. Bei den Mutanten S_C_{1-10}A und S_C_{1-10}A_Y/A, bei denen keine Cysteinreste im zytoplasmatischen Abschnitt vorhanden sind, konnte keine Markierung mit ^{3}H-Palmitat gezeigt werden. Da das TGEV Swt-Protein mit ^{3}H-Palmitinsäure markiert werden konnte, deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die S-Acylierung des TGEV S-Proteins bereits in einem prä-Golgi-Kompartiment erfolgte.

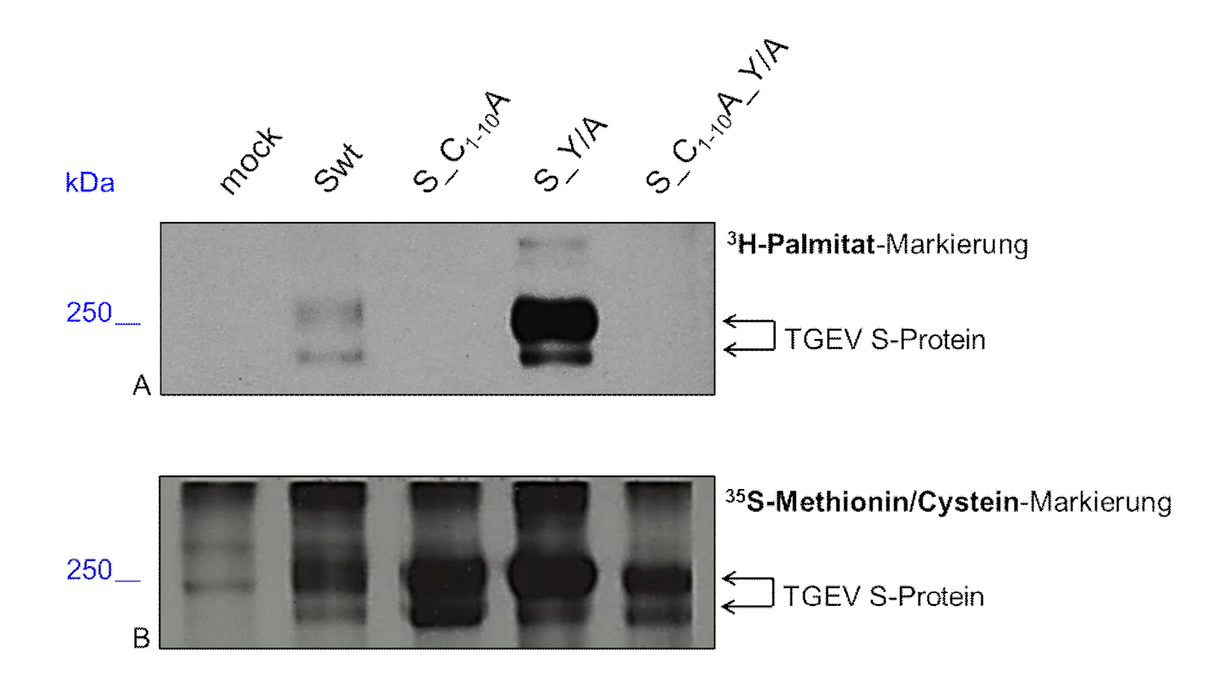


Abb. 4-5 Fluogramme der mit ^{3}H-Palmitat (Bild A) bzw. ^{35}S-Methionin/Cystein (Bild B) markierten TGEV S-Proteinkonstrukte.
Mock: mit leerem Vektor (pCGI) transfizierte Zellen. Expositionszeit ^{35}S-Methionin/Cystein-Fluogramme: 3 Tage. Expositionszeit ^{3}H-Palmitat -Fluogramme: 4 Wochen.

4.1.3 Partielle TGEV S-Cys-Mutanten werden palmitoyliert

Innerhalb der cysteinreichen Region des TGEV S-Proteins kommen zehn Cysteine vor. Die Ergebnisse im Kapitel 4.1.2 zeigten bereits, dass die komplette TGEV S-Cysteinmutante S_C_{1-10}A nicht palmitoyliert wird. Es sollte nun untersucht werden, ob alle dieser zehn Cysteine in der zytoplasmatischen Domäne S-acyliert werden oder nur einzelne oder bestimmte Cystein-Cluster in dieser Region des Proteins.
Um dies herauszufinden, wurden unterschiedliche Cysteinmutanten (Abb. 4-6) untersucht. Innerhalb des cysteinreichen Motivs befinden sich zehn Cysteine, die in dieser Arbeit in drei Cystein-Cluster eingeteilt wurden: Ein N-terminaler membranproximaler Cluster aus drei Cysteinen (C_{1-3}), ein mittlerer Bereich aus vier Cysteinresten (C_{4-7}) und ein C-terminaler Bereich aus drei Cysteinen (C_{8-10}). Die Cysteinmutanten wurden durch entsprechende Substitution der Cysteine durch Alanine erzeugt. Außerdem wurde eine Cysteinmutante getestet in der lediglich die letzten drei C-terminalen Cysteine vorhanden waren (Mutante: S_C_{1-7}A). Die Cys-

teinmutante S_C_{1-10}A und das authentische S-Protein wurden in diesem Experiment als Negativ- bzw. Positivkontrolle mitgeführt.

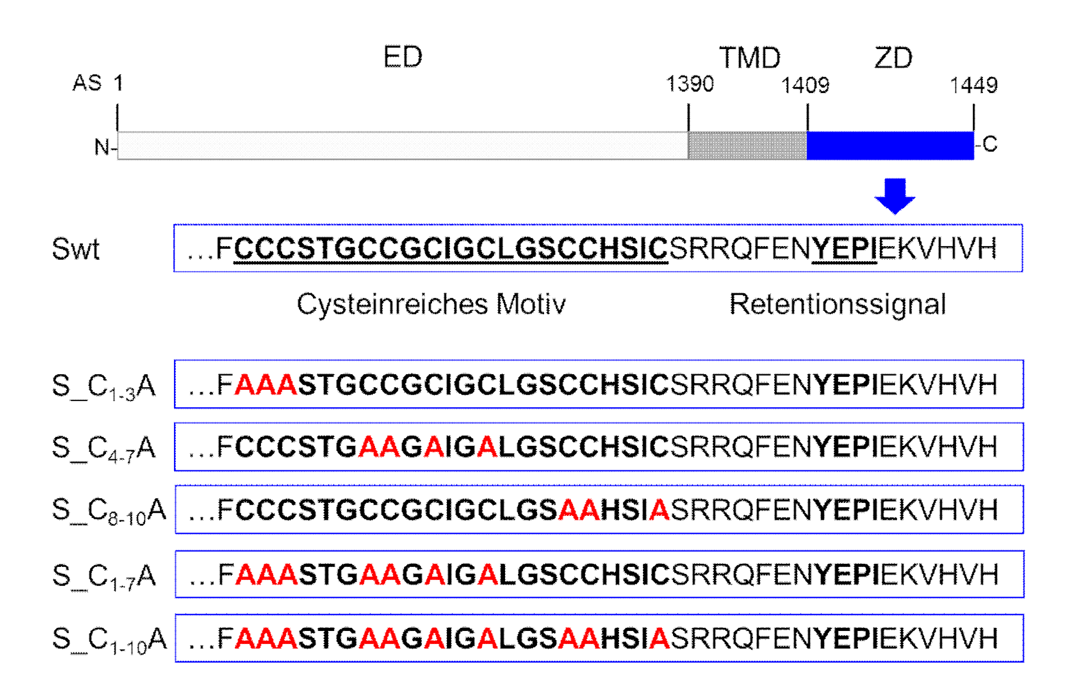


Abb. 4-6 Schematische Darstellung des TGEV-Wildtypproteins und der TGEV S-Cys-Mutanten.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Die beschriebenen Mutanten wurden in BHK 21-Zellen exprimiert und mit ^{35}S-Methionin/Cystein und ^{3}H-Palmitat markiert. Anschließend erfolgte eine Zelllyse und eine IP mit dem mAK 6A.C3 gegen das TGEV S-Protein. Die markierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE separiert und durch Fluorographie sichtbar gemacht (Kapitel 3.7.1.1).

Die Ergebnisse (Abb. 4-7, Bild A) zeigten, dass das authentische S-Protein mit ^{3}H-Palmitat markiert werden konnte, und die Markierung bei der vollen Cysteinmutante S_C_{1-10}A, wie erwartet ausblieb. Zudem konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Cysteinmutanten (S_C_{1-3}A, S_C_{4-7}A, S_C_{8-10}A, S_C_{1-7}A), bei denen nur Teile der Cysteinreiche Region durch Alanine ausgetauscht wurden, das Potential besaßen palmitoyliert zu werden. Wobei die C_{1-7}A, die Mutante bei der nur noch die drei C-terminalen Cysteine erhalten sind, eine etwas schwächere Palmitoylierungsbande zeigte. Zusätzlich zu der S-Proteindoppelbande in der ^{35}S-Methionin/Cystein-Markierung bei einer Höhe von ca. 250 kDa zeigten sich in die-

sem Experiment noch zusätzliche Banden bei einer Laufhöhe über 250 kDa (Abb. 4-7, Bild B). Hierbei handelte es sich sehr wahrscheinlich auch um S-Proteinbanden, da in der mock-transfizierten Laufspur keine dementsprechenden Banden detektierbar waren. Es war zu beobachten, dass diese zusätzlichen Doppelbanden bei allen getesteten S-Proteinen zu erkennen waren, außer bei der S_C_{1-10}A-Mutante. Da das TGEV S-Protein die Fähigkeit besitzt Trimere auszubilden liegt es nahe, dass es sich bei diesen zusätzlichen größeren S-Proteinpositiven Banden um eventuelle Oligomere handeln könnte. Auf diese Fragestellung wird im später folgenden Ergebnisteil (s. Kapitel 4.4) näher eingegangen.

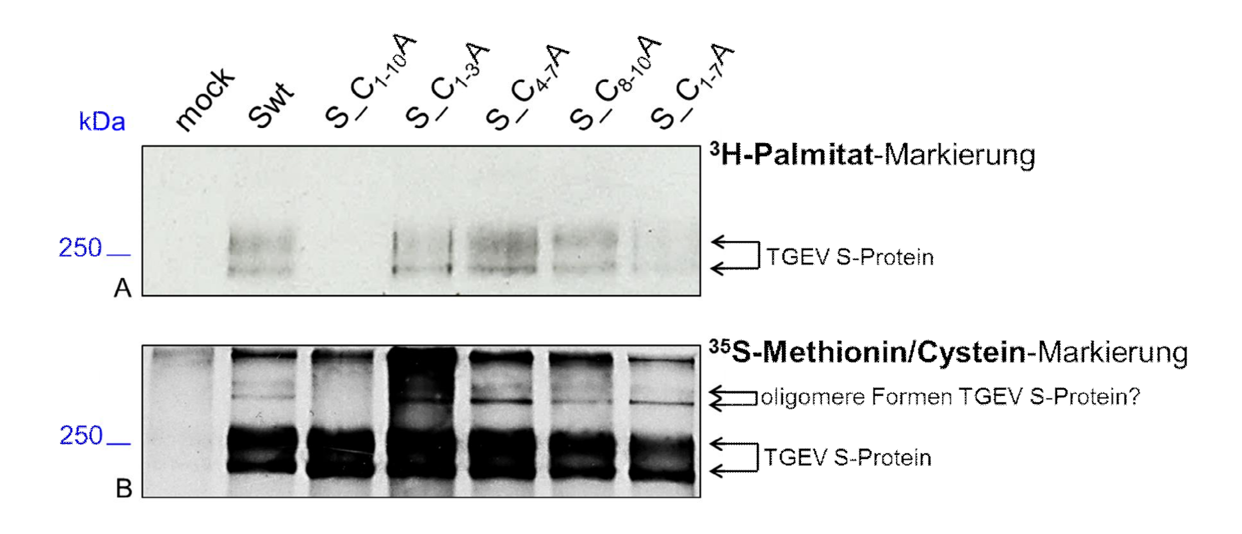


Abb. 4-7 Fluogramme der mit ^{35}S-Methionin/Cystein (Bild B) bzw. ^{3}H-Palmitat (Bild A) markierten TGEV S-Proteinkonstrukte.
Mock: mit leerem Vektor (pCGI) transfizierte Zellen. Expositionszeit ^{35}S-Methionin/Cystein-Fluogramm: 3 Tage. Expositionszeit ^{3}H-Palmitat -Fluogramm: 2 Wochen.

4.1.4 Einfluss der Palmitoylierung auf die TGEV-Infektiösität

Wie bereits in den obigen Kapiteln beschrieben kann die Palmitoylierung von Proteinen eine wichtige Rolle während des Replikationszyklus von Viren einnehmen. Für das Maus Hepatitis Virus (MHV) konnte gezeigt werden, dass die Blockierung der Palmitoylierung des MHV S-Proteins durch 2-Bromo-Palmitat (2-BP) zu einer Verminderung des S-Proteineinbaus in Viruspartikel und somit zu einer Reduktion der Infektiösität führte (Thorp et al., 2006). 2-BP fungiert als ein Palmitatanalog

und ist in der Lage die Palmitoylierung von Proteinen zu inhibieren (Webb et al., 2000).

Um die Bedeutung der Palmitoylierung des S-Proteins für die Infektiösität von TGEV zu untersuchen, wurden ST-Zellen mit TGEV infiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-BP (0,0; 0,8; 4,0; 8,0 und 12,0 µM) inkubiert. Die Auswahl dieser Konzentrationen erfolgte aufgrund von bereits publizierten 2-BP-Studien auf die Virusinfektiösität von MHV (Thorp et al., 2006). Außerdem wurde ein Ansatz mit dem Lösungsmittel von 2-BP, Ethanol, behandelt, um einen negativen Einfluss des Ethanols auf die Virusinfektiösität auszuschließen. Nach einem Tag Inkubation wurden die Zellkulturüberstände der infizierten und 2-BP-behandelten Ansätze gesammelt und mit Hilfe eines Plaquetests die Anzahl an infektiösen Einheiten bestimmt (siehe Kapitel 3.2.3). Als Negativkontrolle diente in diesem Experiment das vesikuläre Stomatits Virus (VSV). Für den VSV-Stamm Indiana ist beschrieben, dass das G-Protein an einem Cystein palmitoyliert wird. Jedoch wirkt sich die Behandlung mit 2-BP nicht negativ auf die Infektiösität von VSV aus (Whitt und Rose, 1991). Dazu wurden Zellen mit VSV infiziert und entsprechend der TGEV-Versuchsreihe behandelt.

4.1.4.1 2-BP-Behandlung führt zu keinem zelltoxischen Effekt

Um einen zytotoxischen Effekt der 2-BP-Behandlung auf die Zellkulturen auszuschließen wurde der WST 1-Test (s. Kapitel 3.1.5) durchgeführt. Dieser Test dient dazu, die Induktion oder Inhibition der Zellproliferation zu analysieren. Er basiert auf der enzymatischen Umsetzung des Tetrazoliumsalz WST-1 durch mitochondriale Succinyl-Dehydrogenasen. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht das dunkel-gelbe Formazan, welches bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann. Der Gehalt an gebildetem löslichem Formazan korreliert mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen und wird in diesem Experiment der Zellproliferation gleichgesetzt. Um die gemessene Absorption in Prozent auszudrücken, wurden die nicht mit 2-BP behandelten Zellen gleich einer Zellproliferationsrate von 100% gesetzt. Die 2-BP behandelten Zellen wurden demensprechend umgerechnet. In der Abb. 4-8 sind die Mittelwerte mit +/- Standardabweichung der Zell-

proliferation in % dargestellt. Es zeigte sich, dass keine 2-BP-Konzentration einen negativen Effekt auf die Zellproliferationsraten der behandelten Zellen ausübte. Die Behandlung mit DMSO hingegen führte zu einem fast vollständigen Erliegen der Zellproliferation.

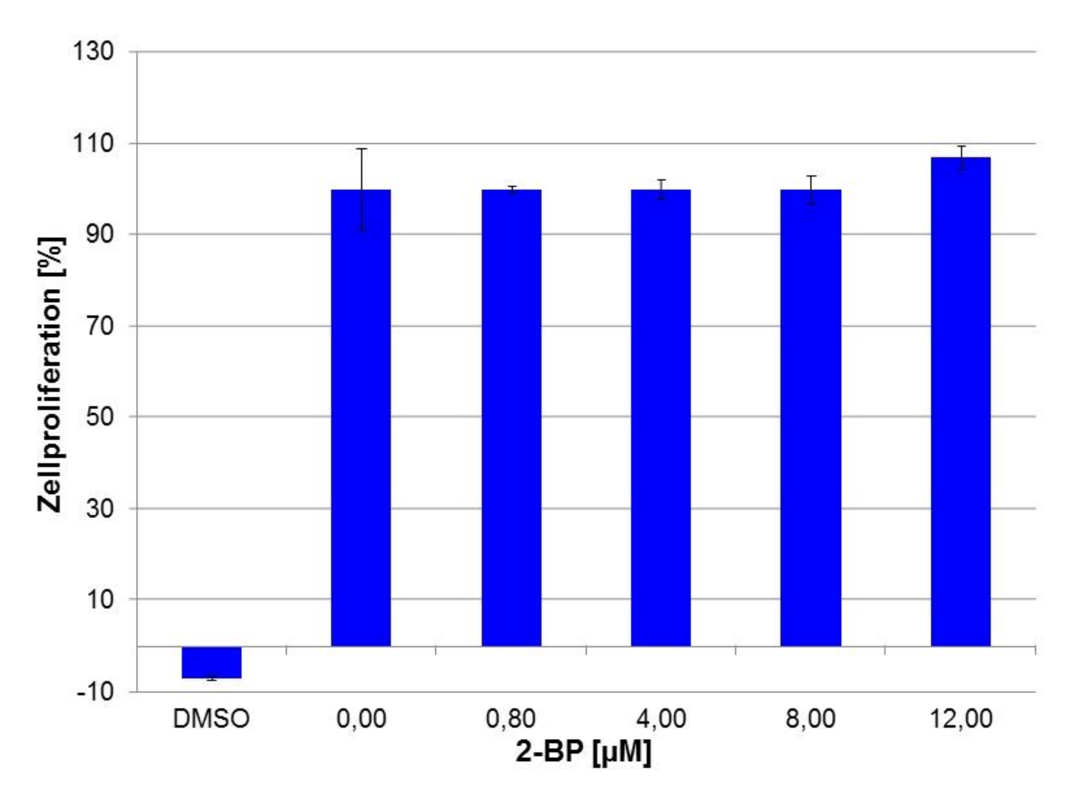


Abb. 4-8 WST 1-Test.
Darstellung der Zellproliferation [%] von 2-BP- bzw. DMSO-behandelten ST-Zellen. Angabe des Mittelwerts +/- Standardabweichung.

4.1.4.2 2-BP-Behandlung führt zu einer Reduktion der TGEV Infektiösität

Mit Hilfe des Plaque-Tests konnte der Titer an infektiösen Einheiten in den mit 2-BP behandelten Proben quantifiziert werden. Die Angabe erfolgte in PFU/ml (engl. *Plaque-forming units*/ml). Bei diesem Test wird die Annahme getroffen, dass ein infektiöses Viruspartikel zur Ausbildung eines Plaques führt. Dieser Test stellte einen indirekten Nachweis dar, um die Bedeutung der Palmitoylierung des S-Proteins für die Virusinfektiösität zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Plaque-Tests (Abb. 4-9) zeigten, dass es zu einem Rückgang der gemessenen PFU/ml aller mit 2-BP behandelten Ansätze im Vergleich zu nicht

mit 2-BP (0,0 µM) behandelten Proben, kam. Die Reduktion der PFU/ml ist dabei konzentrationsabhängig. Die Behandlungen mit 8 und 12 µM 2-BP führten zu einem signifikanten Rückgang der Infektiösität. Bei der Behandlung mit 0,00 µM 2-BP konnte eine PFU/ml von ca. $1x10^{5,8}$ gemessen werden. Bei der Behandlung mit 8,00 µM 2-BP ist der Virustiter in den Zellkulturüberständen der behandelten ST-Zellen um knapp 2 Zehnerpotenzen, auf ca. $1x10^{3,8}$ PFU/ml gesunken.

Die Behandlung mit Ethanol zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die PFU/ml. Somit deutet alles darauf hin, dass der gemessene signifikante Effekt auf die Reduktion der PFU/ml durch die Behandlung mit 2-BP herbeigerufen wurde. Auch der WST-1-Test (Abb. 4-8) zeigte, dass sich 2-BP in keiner der getesteten Konzentrationen negativ auf die Zellproliferation auswirkte, und somit toxisch auf die Zellen wirkte.

Bei der VSV-Versuchsreihe war kein signifikanter Einfluss der 2-BP-Behandlung auf den Virustiter in den Zellkulturüberständen zu erkennen. Allerdings war in der VSV-Testreihe bei der Behandlung mit 12,0 µM 2-BP eine Reduktion der PFU/ml um ca. 2 Zehnerpotenzen zu beobachten, wobei eine relativ hohe Standardabweichung zu beobachten war. Die Angaben in der Literatur besagen, dass eine 2-BP Behandlung keinen Einfluss auf die Infektiösität von VSV ausübt. Daher ist die Beurteilung der 12,0 µM 2-BP-Behandlung in diesem Versuch eher kritisch zu beurteilen.

Die Ergebnisse der TGEV-Testreihe zeigten jedoch deutlich, dass es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Bildung von infektiösen Partikeln durch eine 2-BP-Behandlung kam.

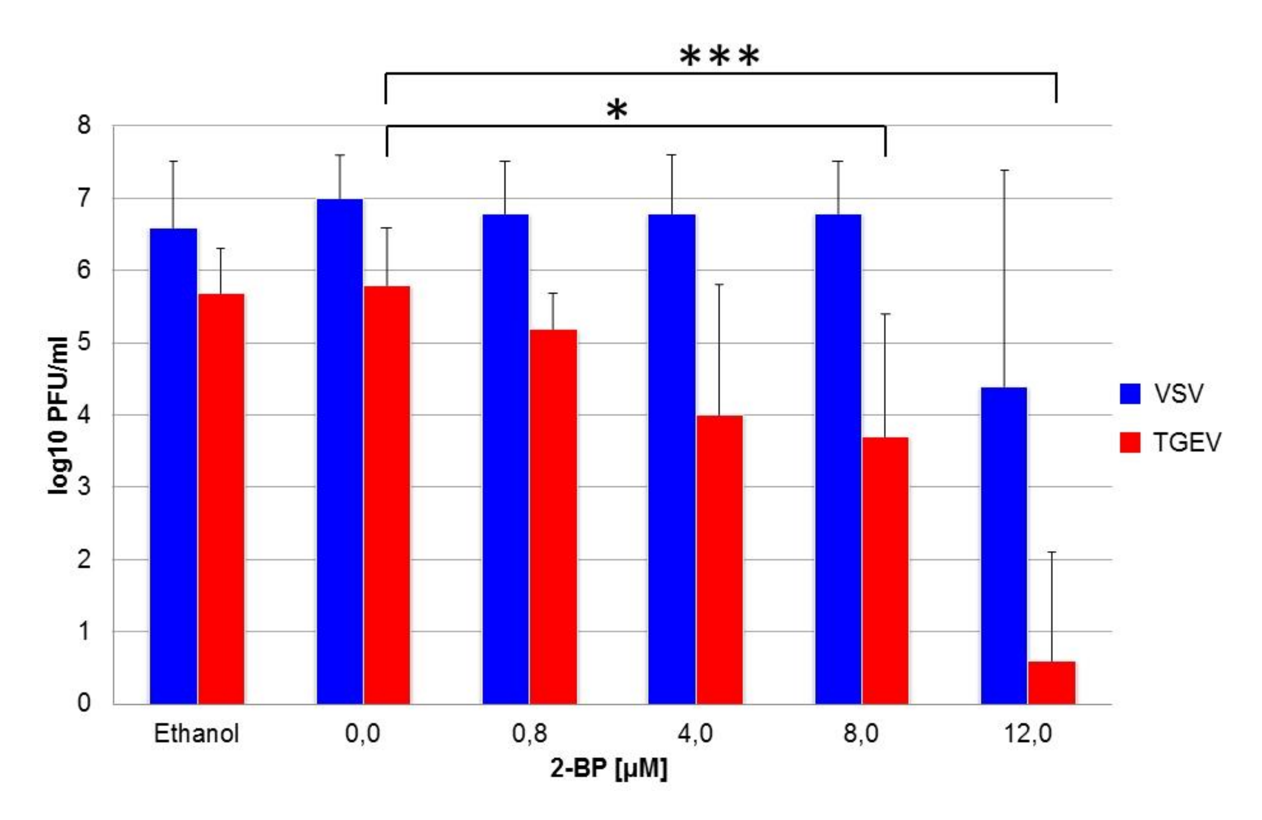


Abb. 4-9 Plaque-Test.
Die Überstände von mit TGEV bwz. VSV infizierten und 2-BP bzw. Ethanol (Negativkontrolle) behandelten Zellen wurden auf das Vorhandensein infektiöser Viruspartikel untersucht. VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus): blauer Datensatz, TGEV (Transmissible Gastroenteritis Virus): roter Datensatz. Die Anzahl der infektiösen Einheiten erfolgte in PFU (Plaque forming units)/ml. Angabe der Mittelwerte + Standardabweichung. Bestimmung der Signifikanzniveaus mittels t-Test. *:$p < 0,05$; ***: $p < 0,002$.

4.2 Untersuchungen zum Einbau des S-Proteins in VLPs und Viruspartikeln

4.2.1 S_$C_{1\text{-}10}$A wird nicht in VLPs eingebaut, partielle Cys-Mutanten hingegen schon

Virusähnliche Partikel (VLPs, *Virus-like particles*) sind Membranvesikel in denen ein oder mehrere virale Strukturproteine eingelagert sind. Der Zusammenbau von VLPs mimt die Assemblierung von vollständigen Viruspartikeln nach. VLPs bieten somit eine gute Möglichkeit, die Interaktion von bestimmten viralen Strukturproteinen während des Zusammenbaus von Viruspartikeln zu untersuchen. Die Bedingungen für die Bildung von VLPs sind von Virus zu Virus unterschiedlich. Für TGEV ist beschrieben, dass die Koexpression des TGEV Membran (M)- und des Envelope (E)-Proteins ausreichend sind für die Bildung von virusähnlichen Partikeln (Baudoux et al., 1998). Das S-Protein ist nicht essentiell für die Ausbildung

von VLPs wird jedoch aufgrund von intakter Interaktion mit dem M-Protein in VLPs eingebaut (Vennema et al., 1996).

Der Einbau des S-Wildtypproteins in VLPs konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen (s. Kapitel 3.8) gezeigt werden. Dazu wurde ein VLP-Assay (s. Kapitel 3.6.5) durchgeführt und die S-Protein-haltigen VLPs wurden mit authentischen TGE-Viruspartikeln verglichen. Die Viruspartikel (Abb. 4-10, Bild A), als auch die VLPs (Abb. 4-10, Bild B) zeigen die charakteristische morphologische Erscheinung der S-Proteine auf der Partikeloberfläche.

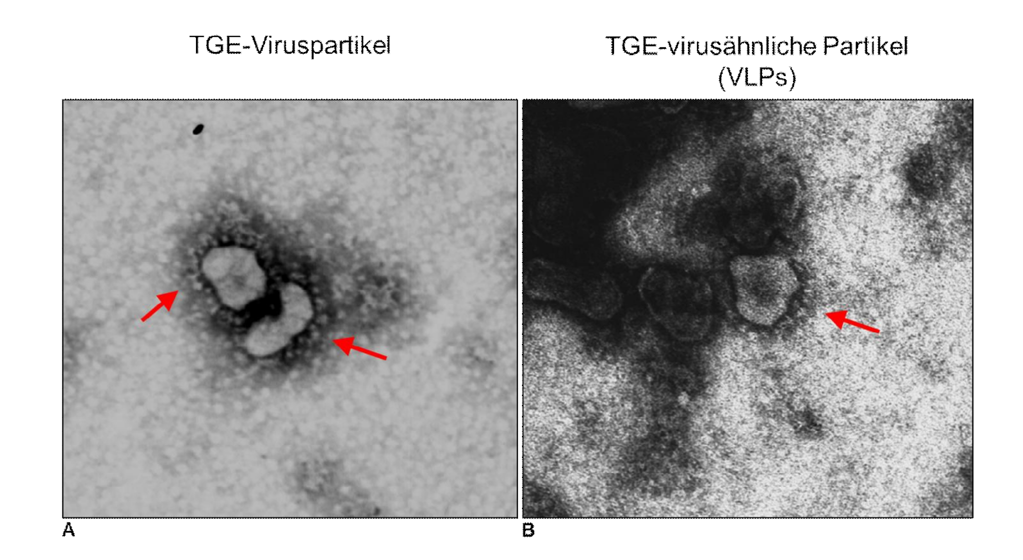


Abb. 4-10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von TGE-Viruspartikeln und TGE-virusähnlichen Partikeln (VLPs). Negativkontrastierung
Charakteristische peplomere Strukturen sind auf der Oberfläche der Partikel zu sehen, die durch das S-Protein gebildet werden (rote Pfeile).

Mit Hilfe des VLP-Assays sollten verschiedene Cys-Mutanten (Abb. 4-11) untersucht werden, um einen Aufschluss darüber zu erhalten, ob das cysteinreiche Motiv generell notwendig ist für den Einbau des S-Proteins in VLPs und wenn ja, ob bestimmte Cystein-Cluster unterschiedliche Bedeutungen beim Einbau des S-Proteins haben. Dazu wurden die Cys-Mutanten (Abb. 4-11) zusammen mit dem E- und M-Protein bzw. leerem Vektor (zur Einzelexpression) kotransfiziert. Werden VLPs von den transfizierten Zellen gebildet, so werden sie wie vollständige Viruspartikel aus den Zellen entlassen und in das Zellkulturmedium sezerniert. Mit Hilfe der Ultrazentrifugation dieser Zellkulturüberstände über ein Saccharosekissen ist

es möglich die entstanden VLPs zu isolieren und mittels SDS-PAGE und Westernblot auf das Vorhandensein von bestimmten viralen Strukturproteinen zu untersuchen (s. Kapitel 3.6.5).

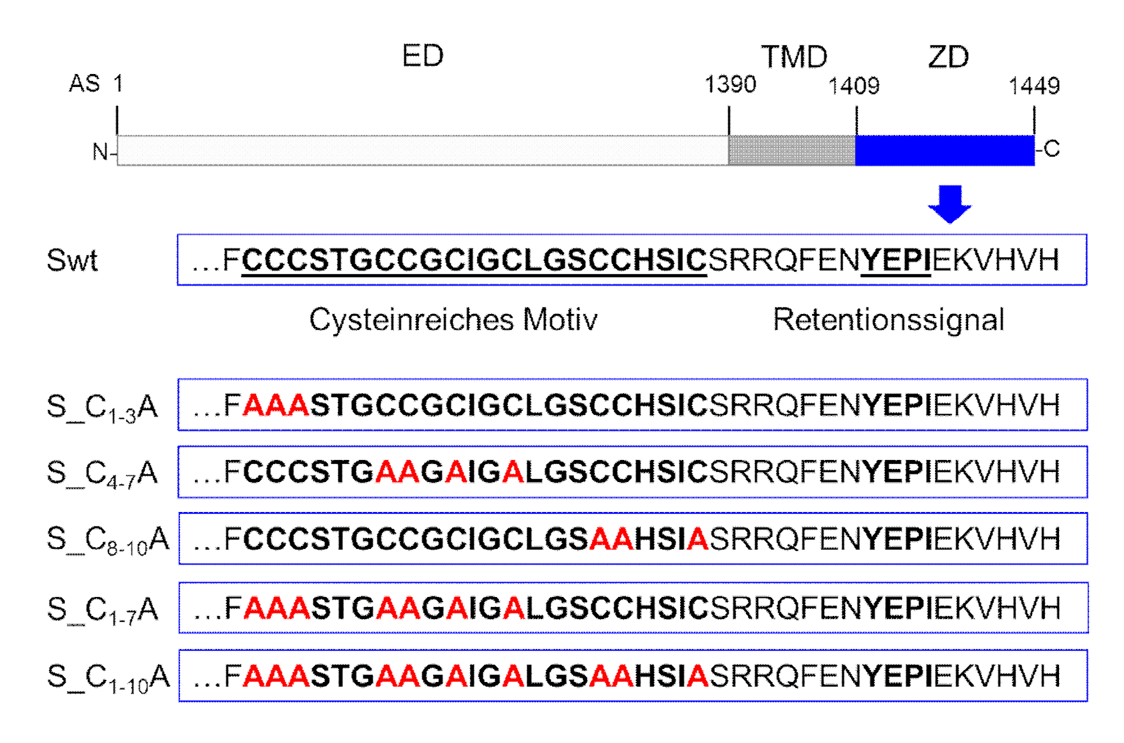


Abb. 4-11 Schematische Darstellung des TGEV-Wildtypproteins und der TGEV S-Cysteinmutanten.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Die Cysteinmutanten besaßen das intakte tyrosinbasierte Retentionssignal und zeigten keine Oberflächenlokalisation in Einzelexpression in Immunfluoreszenzanalysen (s. Kapitel 4.2.2.1). Denn werden die Proteine an der Plasmamembran exprimiert, kann es unter Umständen zu einer Abschnürung von proteinhaltigen Membranvesikeln kommen (Fang et al., 2007; Booth et al., 2007) die eine Bildung von S-Proteinhaltigen VLPs vortäuschen könnten.

In Abb. 4-12 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung (Bilder C und D) ist die Expression des S- und des M-Proteins in den Zelllysaten zu sehen. Die Proteine werden in allen Ansätzen exprimiert, in denen die Transfektion mit den entsprechenden cDNAs erfolgte. Im oberen Teil der Abb. 4-12 (Bilder A und B) sind die Ergebnisse der Zellkulturüberstandsproben zu erkennen. Die Koexpression des Swt-Proteins mit den M- und E-Proteinen diente als Positivkontrolle für die Bildung von S-Proteinhaltigen VLPs. Es zeigte

sich ebenfalls, dass in allen Ansätzen in denen cDNAs des M- und des E-Proteins kotransfiziert wurden, das M-Protein in den Überständen nachzuweisen war. Dies sprach für eine Bildung von VLPs in diesen Ansätzen. Die Koexpression der S-Cysteinmutanten $C_{1-3}A$, $C_{4-7}A$, $C_{8-10}A$, $C_{1-7}A$, in denen einzelne Bereiche der cysteinreichen Region substituiert sind, führte ebenfalls wie bei dem authentischen S-Protein zur Bildung von S-Proteinhaltigen VLPs. Die Einzelexpression dieser Mutanten zeigt hingegen keinen Nachweis in den Überstandsproben. Im Gegensatz dazu war die S-Cys-Mutante $C_{1-10}A$, in der die komplette cysteinreiche Region substituiert wurde, nicht in den Überständen detektierbar, obwohl das Vorhandensein von VLPs durch den Nachweis des M-Proteins gezeigt werden konnte.

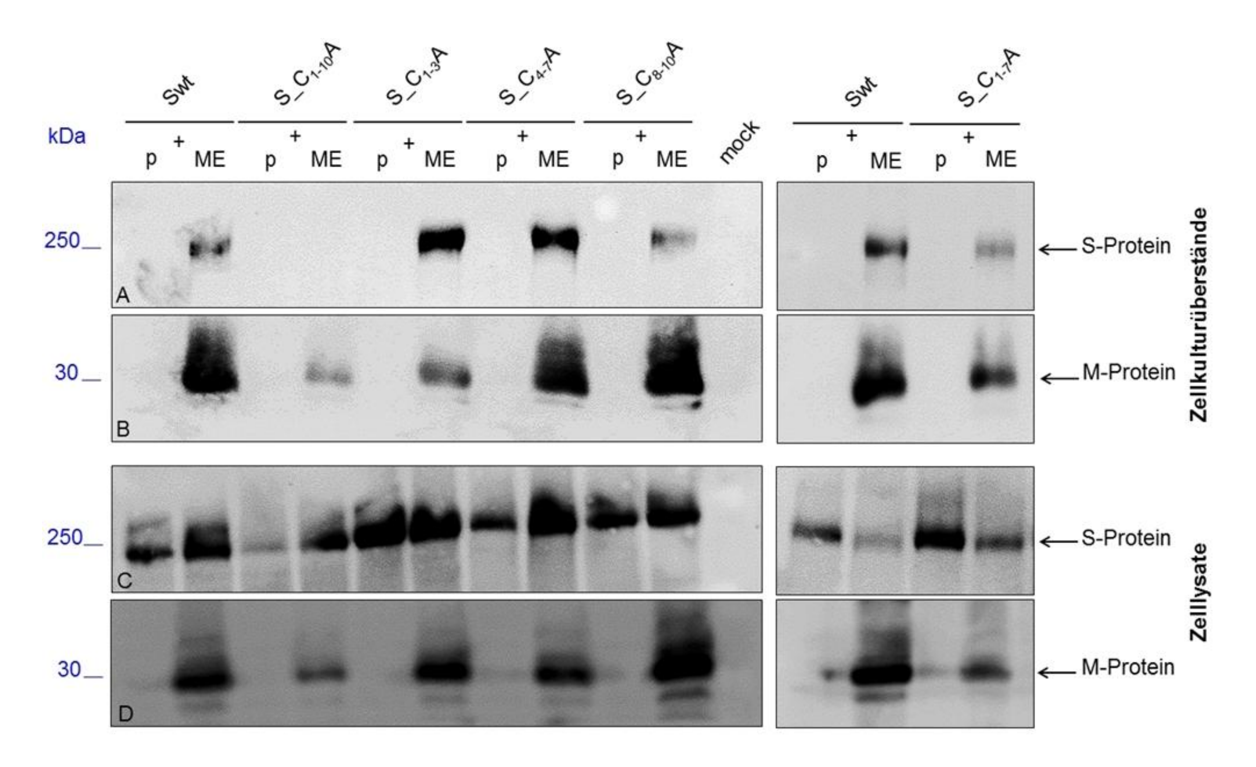


Abb. 4-12 Westernblotanalyse der Zellkulturüberstände (Bild A und B) und der Zelllysate (Bild C und D) der VLP-Tests.
Die Detektion des TGEV S- bzw. M-Proteins erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (S-Protein: 6A.C3 (aus Maus), M-Protein: 9D.B4 (aus Maus)) und einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper gerichtet gegen Maus.

Die Ergebnisse dieser Tests zeigten, dass die partiellen TGEV S-Cysteinmutanten ($C_{1-3}A$, $C_{4-7}A$, $C_{8-10}A$, $C_{1-7}A$) das Potential haben in VLPs eingebaut zu werden, aber nicht die Mutante in der kein Cysteinrest im zytoplasmatischen Abschnitt des TGEV S-proteins vorhanden ist ($S_C_{1-10}A$). Es lässt sich außerdem sagen, dass kein bestimmter Cystein-Cluster für den Einbau des S-Proteins in die VLPs verantwortlich war.

4.2.2 Untersuchungen zum Oberflächentransport

Die Untersuchung von VLPs mittels Immunfluoreszenzanalyse (IFA) diente in der vorliegenden Arbeit dazu, die Ergebnisse aus dem obigen VLP-Test (Kapitel 4.2.1) zu bestätigen und um weitere TGEV S-Cysteinmutanten und TGEV S-/VSV-G-Chimären auf ihr Potential zum Einbau in VLPs zu untersuchen.

Dazu wurden die unterschiedlichen S-Mutanten/-Chimären mit M- und E-Protein koexprimiert und mit S-Mutanten/-Chimären in Einzelexpression (Expression mit leerem pCGI-Vektor) in Immunfluoreszenzanalysen (IFA) verglichen (s. Kapitel 3.6.1). Die S-Proteindetektion auf der Zelloberfläche erfolgte ohne vorherige Membranpermeabilisierung (-Triton). Die intrazelluläre Detektion der Proteine M und S wurde durch eine Membranpermeabilisierung (+Triton) vor der Antikörperinkubation gewährleistet.

4.2.2.1 S_C$_{1-10}$A zeigt keine Oberflächenexpression in Koexpression mit M- und E-Protein, partielle Cys-Mutanten hingegen schon

Die untersuchten Cys-Mutanten sind in der Abb. 4-13 dargestellt. In diesen Experimenten wurde eine weitere Cys-Mutante, S_C$_{4-10}$A, untersucht, bei der ausschließlich der N-terminale Cystein-Cluster in dem CRM vorhanden war.

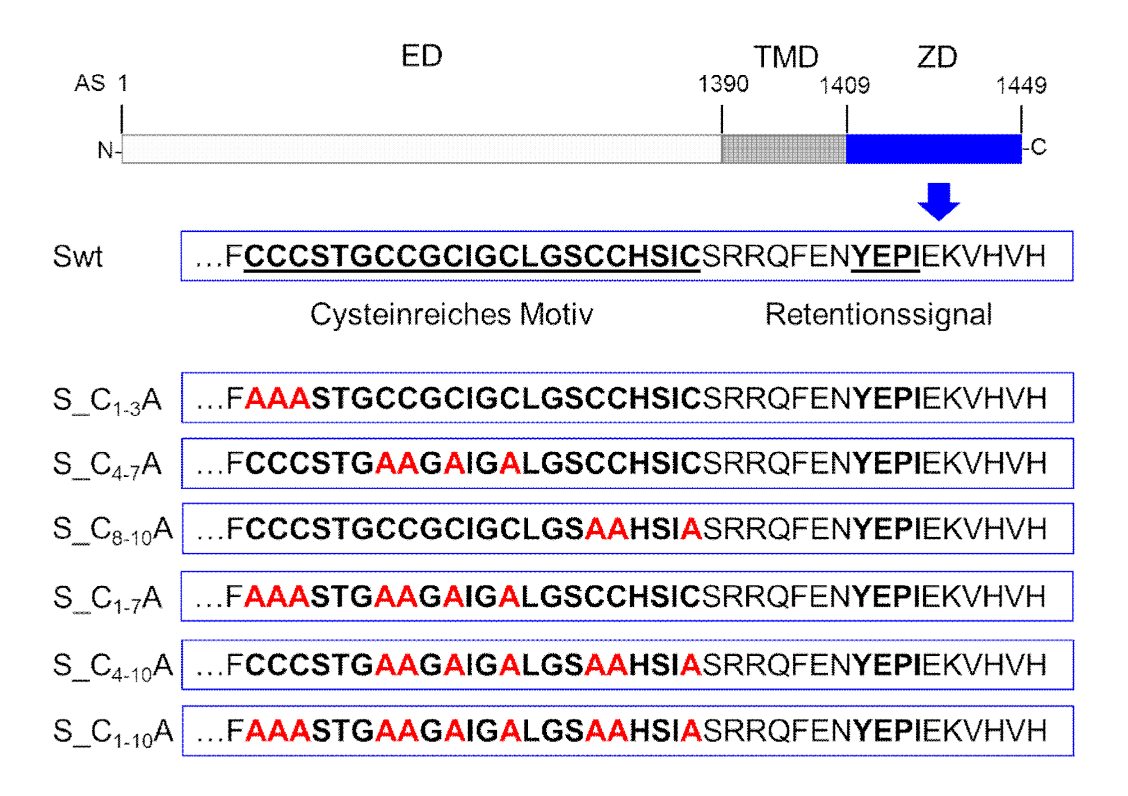


Abb. 4-13 Schematische Darstellung des TGEV-Wildtypproteins und der TGEV S-Cysteinmutanten.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Die Ergebnisse der IFA zeigten, dass weder das authentische TGEV S-Protein noch die untersuchten Cys-Mutanten in Einzelexpression an der Zelloberfläche zu detektieren waren (Abb. 4-14, Bilder A-G).

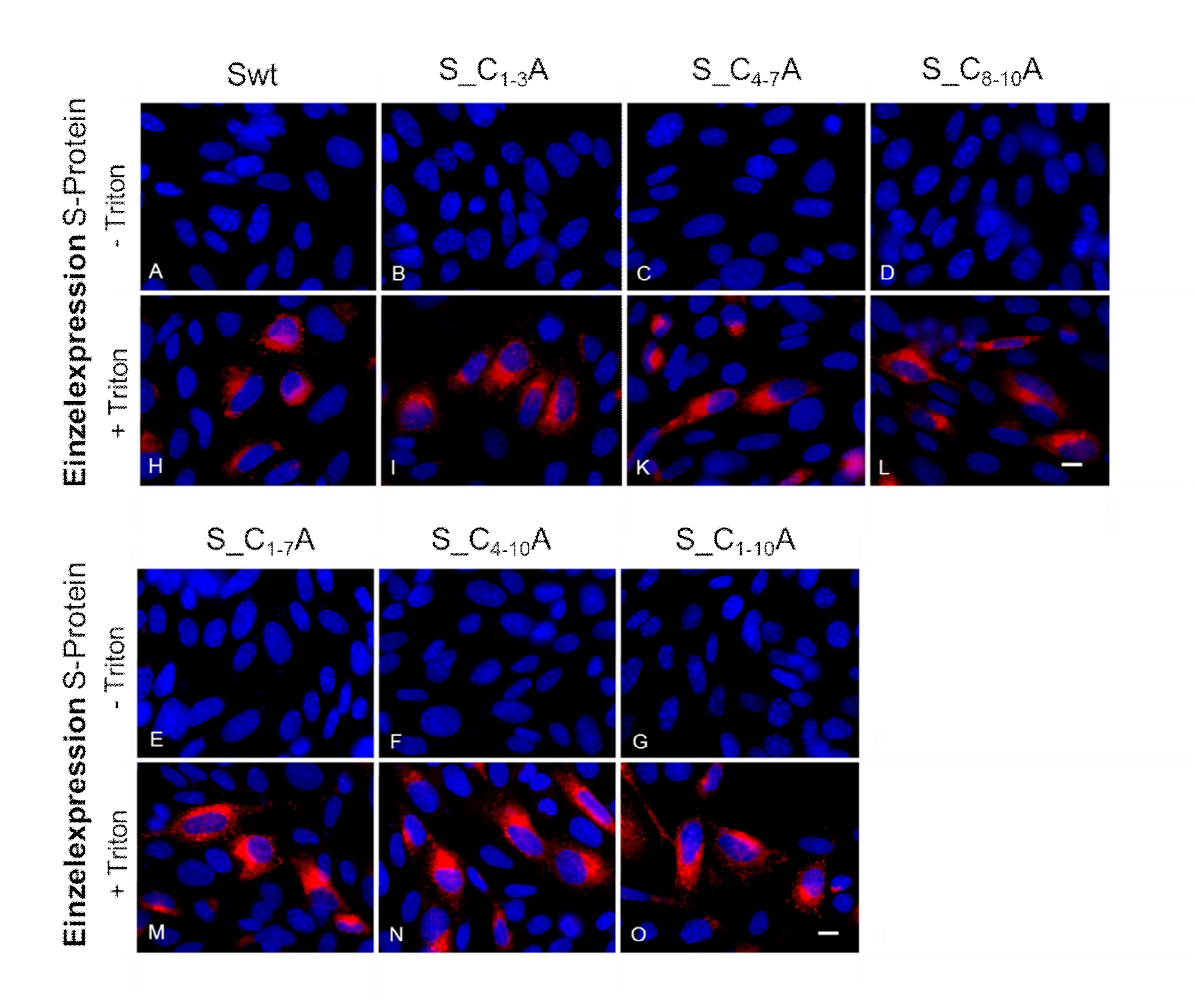


Abb. 4-14 Immunfluoreszenzanalyse des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV S-Cysteinmutanten in Einzelexpression.
Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper gerichtet gegen Maus. Das S Protein ist in rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI visualisiert und sind in blau zu erkennen. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung (+Triton). Die Detektion der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte ohne Membranpermeabilisierung (-Triton) vor der Antikörperinkubation. Maßstab: 10 µm.

In Koexpression mit dem M- (Abb. 4-15, Bild P) und dem E-Protein zeigte sich jedoch, dass das authentische S-Protein auf der Zelloberfläche zu lokalisieren war (Abb. 4-15, Bild A). Außerdem konnten die unterschiedlichen partiellen Cys-Mutanten (S_C_{1-3}A, S_C_{4-7}A, S_C_{8-10}A, S_C_{1-7}A, S_C_{4-10}A) ebenfalls in Koexpression mit dem M- (Abb. 4-15, Bilder Q-U) und dem E-Protein auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4-15, Bilder B-F). Die volle Cys-Mutante, S_C_{1-10}A, hingegen konnte in Koexpression mit dem M- (Abb. 4-15, Bild V) und dem E-Protein nicht auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4-15, Bild G).

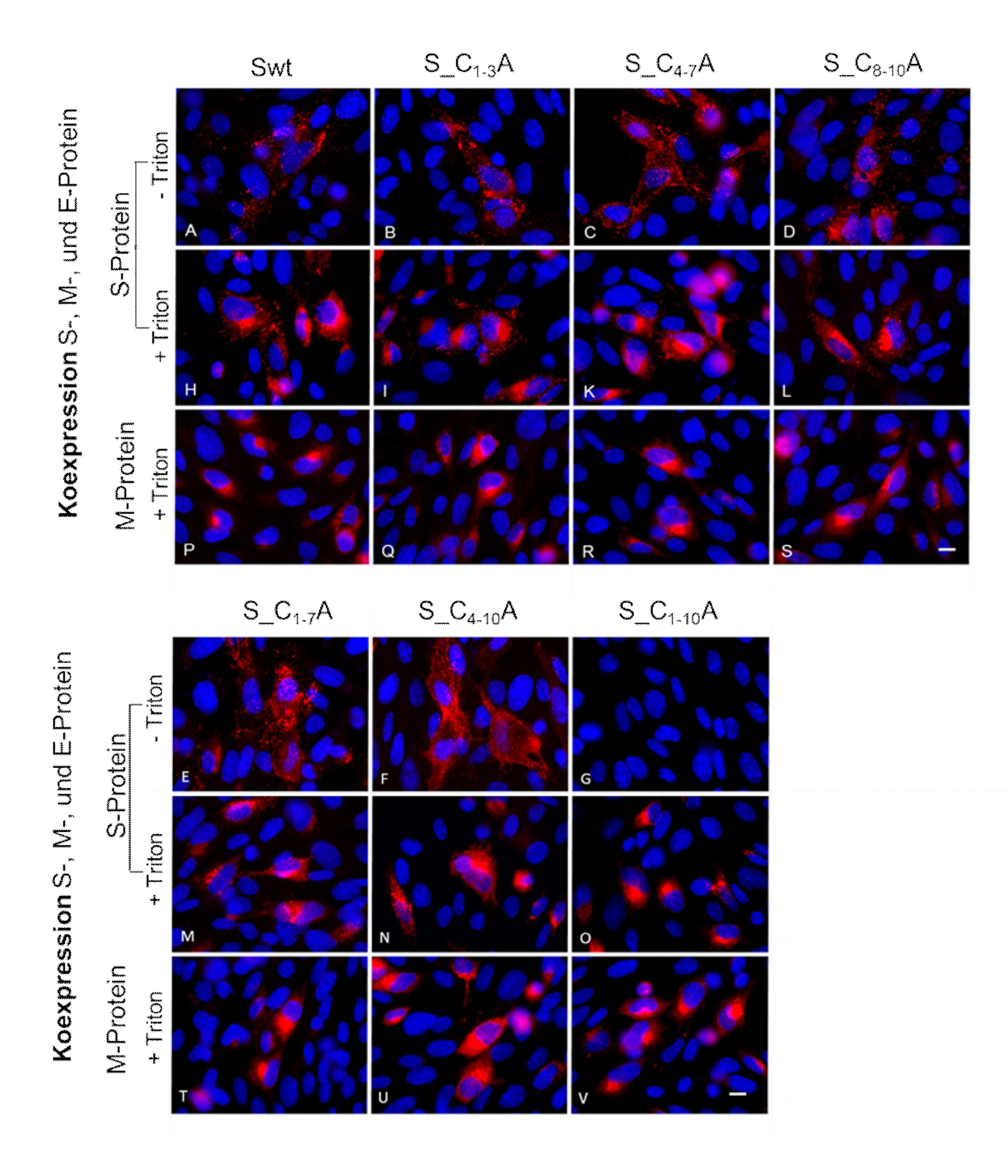


Abb. 4-15 Immunfluoreszenzanalyse des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV S-Cysteinmutanten in Koexpression mit den M- und E-Proteinen.
Die Detektion des TGEV S- bzw. M-Proteins erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (S-Protein: 6A.C3 (aus Maus), M-Protein: 9D.B4 (aus Maus)) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper gerichtet gegen Maus. Das S- sowie das M-Protein sind in Rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI visualisiert und sind in blau zu erkennen. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung (+Triton). Die Detektion der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte ohne Membranpermeabilisierung (-Triton) vor der Antikörperinkubation. Maßstab: 10 µm.

4.2.2.2 GGS-Chimären zeigen keine Oberflächenexpression in Koexpression mit M- und E-Proteinen

Mit Hilfe der TGEV S-/VSV G-Chimären GGS16 und GGS40 sollte näher betrachtet werden, ob das cysteinreiche Motiv der zytoplasmatischen Domäne des TGEV S-Proteins ausreichend ist für den Einbau in VLPs, bzw. in wie weit die Transmembrandomäne des S-Proteins eine Rolle spielt. In der Abbildung 4-16 sind die Konstrukte der Chimären schematisch dargestellt. Beide Chimären, GGS16 und GGS40, besitzen die Ektodomäne (ED) und die Transmembrandomäne (TMD) des G-Proteins von VSV. Bei der GGS16 sind an die VSV-TMD die letzten 16 C-terminalen Aminosäuren des TGEV S-Proteins fusioniert, bei der GGS40 die letzten 40 Aminosäuren (der komplette zytoplasmatische Abschnitt des TGEV S-Proteins).

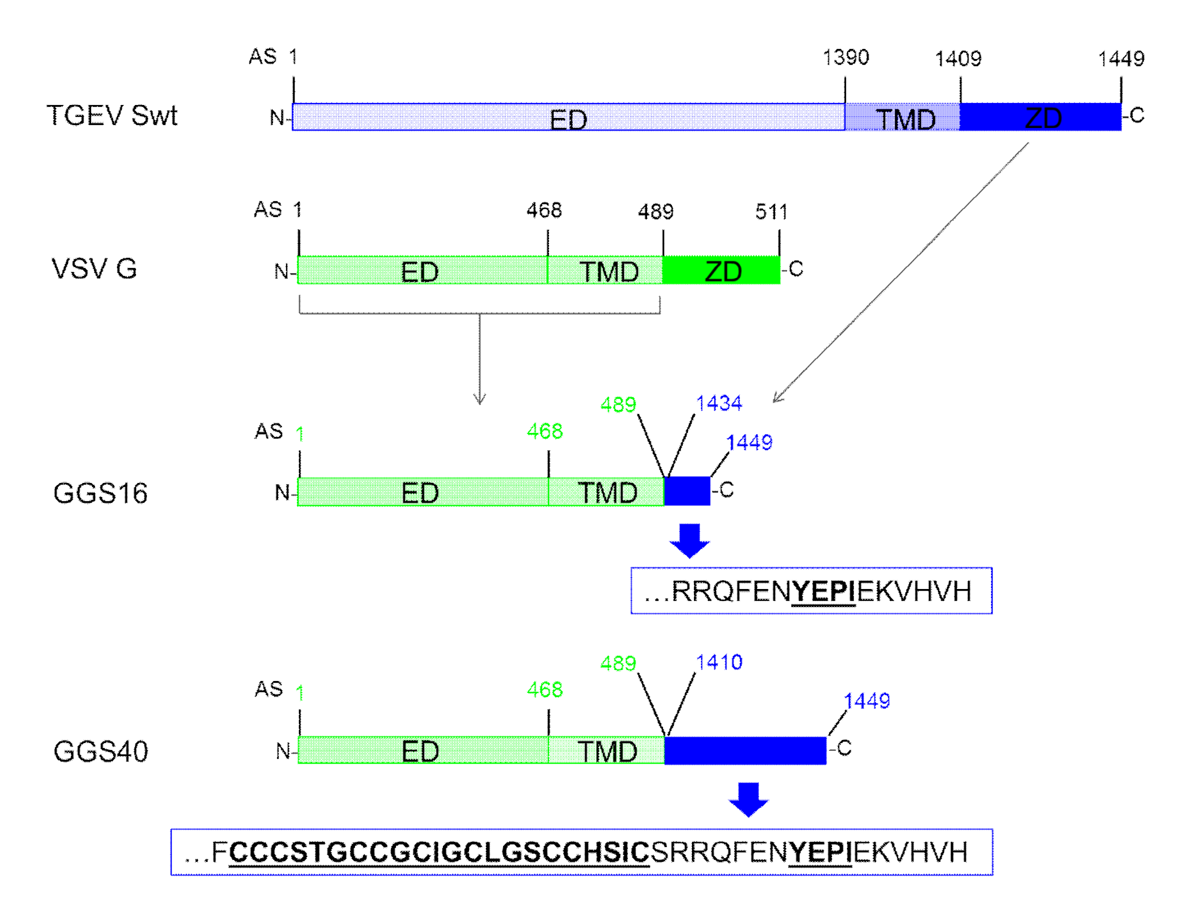


Abb. 4-16 Schematische Darstellung der Proteinchimären.
Blaue Proteindomänen: TGEV S-Protein. Grüne Proteindomänen: VSV G-Protein. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne. Unterstrichene Aminosäurensequenzen zeigen die cysteinreiche Region bzw. das Retentionssignal der ZD des TGEV S-Proteins an.

Die Chimären GGS16 und GGS40, zeigten keine Oberflächenlokalisation in Einzelexpression (Abb. 4-17, Bilder A-C).

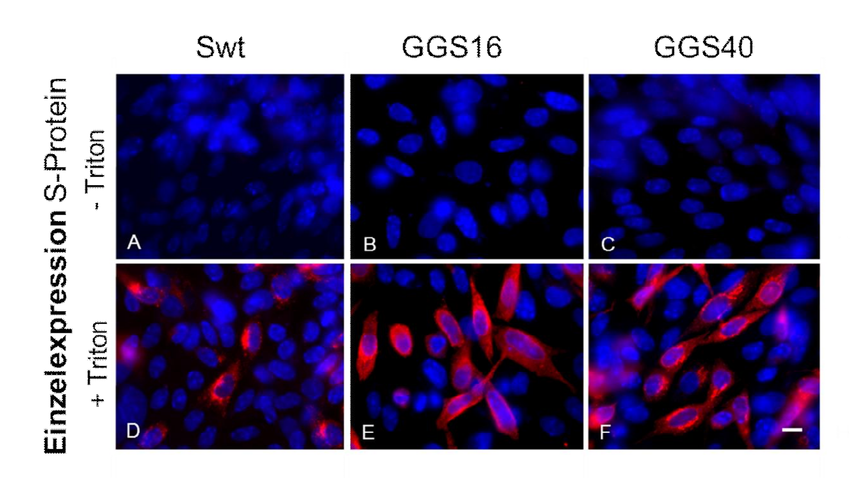


Abb. 4-17 Immunfluoreszenzanalyse des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV/VSV-S/G-Proteinchimären in Einzelexpression.
Die Detektion des Swt-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper gerichtet gegen Maus. Die Detektion der Chimären erfolgte mit den anti-VSV G-Protein-Antikörper I1 und I14 (aus Maus) und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper gerichtet gegen Maus. Das S-Protein sowie die Chimären sind in rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI visualisiert und sind in Blau zu erkennen. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung (+Triton). Die Detektion der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte ohne Membranpermeabilisierung (-Triton) vor der Antikörperinkubation. Maßstab: 10 µm.

In Koexpression mit den TGEV M- und E-Proteinen war es für die GGS16 Chimäre, bei der keine CRM des TGEV S-Proteins vorhanden war, nicht möglich an die Oberfläche zu wandern (Abb. 4-18, Bild B). Jedoch auch die GGS40 Chimäre, in der sich der vollständige zytoplasmatische Abschnitt des TGEV S-Proteins mit CRM befand, konnte nicht an der Zelloberfläche in Koexpression mit M und E-Proteinen detektiert werden (Abb. 4-18, Bild C).

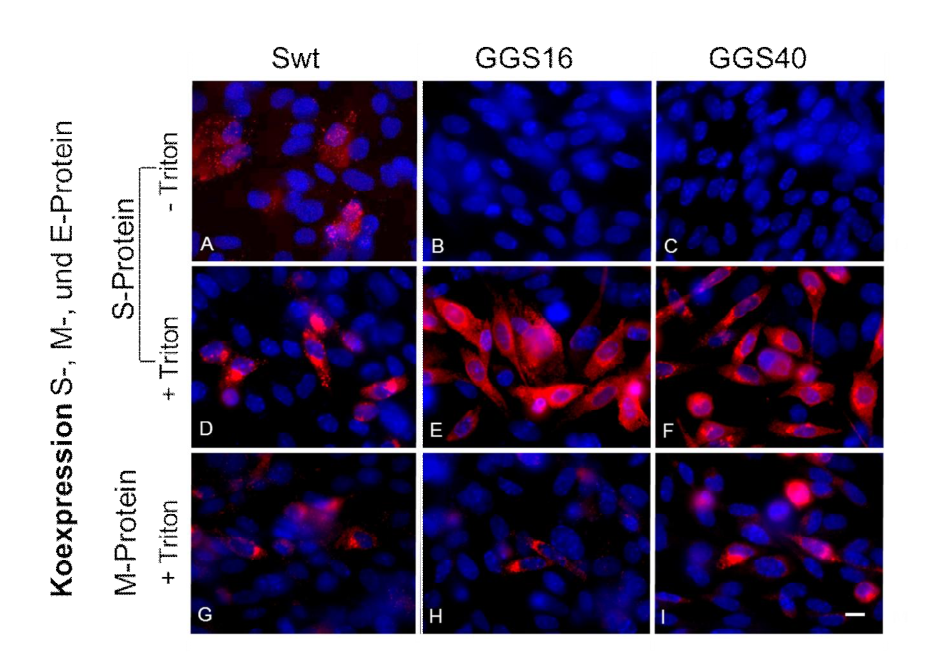


Abb. 4-18 Immunfluoreszenzanalyse des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV/VSV-S/G-Chimären in Koexpression mit den TGEV M- und E-Proteinen.
Die Detektion des TGEV S-, der Chimären bzw. M-Proteins erfolgte mit monoklonalen Antikörpern (S-Protein: 6A.C3 (aus Maus), M-Protein: 9D.B4 (aus Maus), G-Protein: I1 und I14 (aus Maus)) und einem sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper gerichtet gegen Maus. Das S-, die Chimären sowie das M-Protein sind in rot dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI visualisiert und sind in blau zu erkennen. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung (+Triton). Die Detektion der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte ohne Membranpermeabilisierung (-Triton) vor der Antikörperinkubation. Maßstab: 10 µm.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass der Transport an die Zelloberfläche nicht alleine durch das Vorhandensein des cysteinreichen Motivs bestimmt wird, sondern vermutlich die Transmembrandomäne des S-Proteins ebenfalls eine Rolle spielt.

4.2.3 Die Komplementierung von rTGEV_YI/AA mit S_$C_{1\text{-}10}$A führt nicht zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln

Das Genom von Coronaviren hat eine Länge von ca. 30 kb und ist somit das Größte unter den bekannten RNA-Viren. Im Jahr 2000 ist es Almazan et al. gelungen ein cDNA-basiertes reverses Genetik-System für TGEV zu entwickeln (Almazan et al., 2000). Dazu wurde eine cDNA, codierend für das infektiöse TGEV RNA-Genom, in ein *Bacterial artificial chromosome* (BAC) kloniert. BACs sind *low-copy*-Plasmide, die es erlauben stabil, große DNA-Sequenzen in Bakterienzellen zu klonieren. Mit Hilfe dieses BAC-reversen Genetik-Systems ist es möglich Muta-

tionen in bestimmte Gene des Virusgenoms einzubringen und den daraus resultierenden Phänotyp zu studieren.

In unserer Arbeitsgruppe ist es bereits gelungen eine solche rTGEV BAC-DNA zu mutieren, um das tyrosinbasierte Retentionssignal des TGEV S-Proteins während der Virusreplikation näher zu untersuchen. Dabei wurde die Mutation YI/AA in das Retentionssignal des TGEV S-Proteins eingefügt (Abb. 4-19). Das rekombinante TGEV mit der YI/AA-Mutation im S-Protein (rTGEV_S_YI/AA), war nicht in der Lage Zellen zu infizieren. Wird jedoch ein Begleitplasmid, codierend für das TGEV S-Wildtypprotein, *in trans* während der Transfektion bereitgestellt, findet eine Komplementierung statt und es entstehen infektiöse Viruspartikel (Shahwan et al., 2014, Manuskript in Vorbereitung).

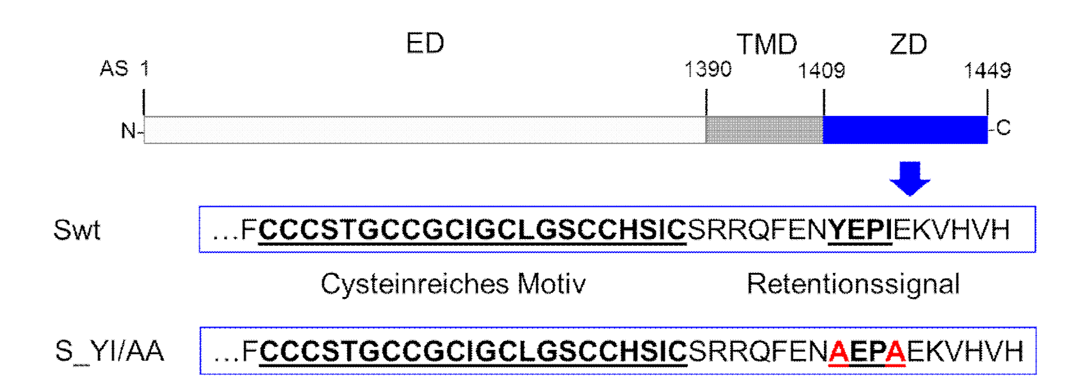


Abb. 4-19 Schematische Darstellung des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der S_YI/AA-Mutante.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmatische Domäne.

Die Methode der BAC-Komplementierung (s. Kapitel 3.2.4) wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Bedeutung des cysteinreichen Motivs innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des TGEV S-Proteins im Kontext der Virusreplikation zu untersuchen.

Dazu wurden BHK 21-Zellen mit BAC-DNA codierend für rTGEV_Swt oder rTGEV_S_YI/AA transfiziert. Zusätzlich wurde rTGEV_S_YI/AA BAC-DNA mit einem Begleitplasmid codierend für Swt-Protein oder die S_$C_{1\text{-}10}$A-Mutante *in trans* komplementiert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Überstände der BHK 21-Zellen abgenommen und ST-Zellen wurden damit infiziert. Zwei Tage nach In-

fektion wurden die ST-Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenzanalyse gegen das TGEV S-Protein durchgeführt (s. Kapitel 3.6.1).

Die Ergebnisse in der Abbildung 4-20 (Bild A) zeigten, dass das rekombinante rTGEV_Swt in der Lage war ST-Zellen zu infizieren, denn das S-Protein war in den ST-Zellen detektierbar. Das rTGEV_S_YI/AA in Einzelexpression konnte keine Infektion der ST-Zellen hervorrufen (Abb. 4-20, Bild B). Jedoch konnte das rTGEV_S_YI/AA mit Swt-Protein komplementiert werden und eine Infektion der ST-Zellen herbeiführen (Abb. 4-20, Bild C). Wurde allerdings die S_C_{1-10}A-Mutante in *trans* komplementiert, konnten keine infizierten ST-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4-20, Bild D).

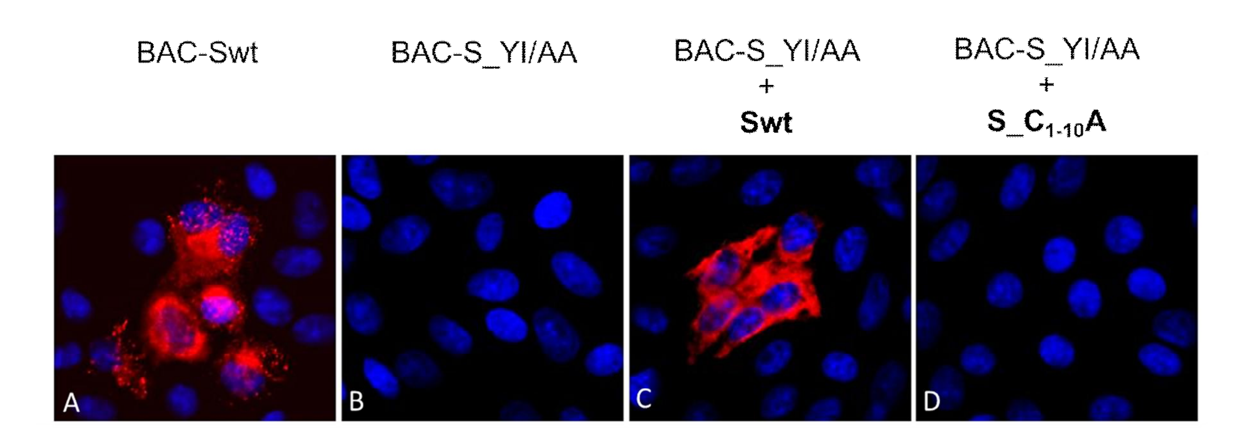


Abb. 4-20 Immunfluoreszenzanalysen der infizierten ST-Zellen aus dem rTGEV-Komplementierungs-Assays.
Die Detektion des TGEV S-Proteins (rot) erfolgte nach Membranpermeabilisierung. Die Zellkerne sind DAPI gefärbt (blau).

Da die Ergebnisse zuvor (s. Kapitel 4.2.1) bereits gezeigt haben, dass die S_C_{1-10}A-Mutant auch nicht in VLPs eingebaut wird, war es zu vermuten, dass sie ebenfalls nicht das Potential besitzt rTGEV_S_YI/AA zu komplementieren und dafür zu sorgen, dass es zur Bildung von infektiösen Viruspartikeln kommt. Weitere Untersuchungen mit den partiellen Cysteinmutanten, die noch die Fähigkeit besitzen in VLPs integriert zu werden, wären sehr interessant. Leider konnten diese weiterführenden Versuche in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, da es aufgrund von Mutationen in den BAC-DNAs zu Veränderungen im Virusgenom gekommen war und es einer aufwendigen Umklonierung bedarf, um wieder neue BAC-DNA für die Experimente zu präparieren.

4.3 Untersuchungen zur Interaktion des TGEV S- und M-Proteins

In dem vorherigen Kapitel 4.2 wurden die Bedingungen für den Einbau des TGEV S-Proteins in Viruspartikel untersucht. Während des Zusammenbaus von Coronaviruspartikeln interagieren die unterschiedlichen Strukturproteine wie das E-, das M-, und das S-Protein über Protein-Protein-Interaktionen miteinander (Opstelten et al., 1995; Corse and Machamer, 2003; Cornelis et al., 2000). In diesem Kapitel wird nun ein Blick auf die S- und M-Protein-Interaktion geworfen. Für die *Betacoronaviren* MHV und SARS-CoV ist bekannt, dass die Palmitoylierung des S-Proteins wichtig ist für den Einbau in VLPs bzw. Viruspartikel (Thorp et al., 2006; Ujike et al., 2012). Jedoch ist die Palmitoylierung des SARS-CoV S-Proteins, im Gegensatz zum MHV S-Protein, nicht notwendig für die Interaktion mit dem virus-entsprechendem M-Protein (Thorp et al., 2006; Ujike et al., 2012).

Hier wurde untersucht, ob die Bedingungen für den Einbau des *Alphacoronavirus* TGEV S-Proteins in neue Viruspartikel dieselben sind, wie die, für die Interaktion mit dem M-Protein.

4.3.1 Hat das Retentionssignal des S-Proteins eine Bedeutung bei der S-M-Proteininteraktion?

Das TGEV S-Protein besitzt ein tyrosinbasiertes Retentionssignal YEPI (Abb. 4-21) im zytoplasmatischen Abschnitt des Proteins (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Dieses Signal sorgt für den intrazellulären Rückhalt des Proteins im ERGIC (Paul et al., 2014).

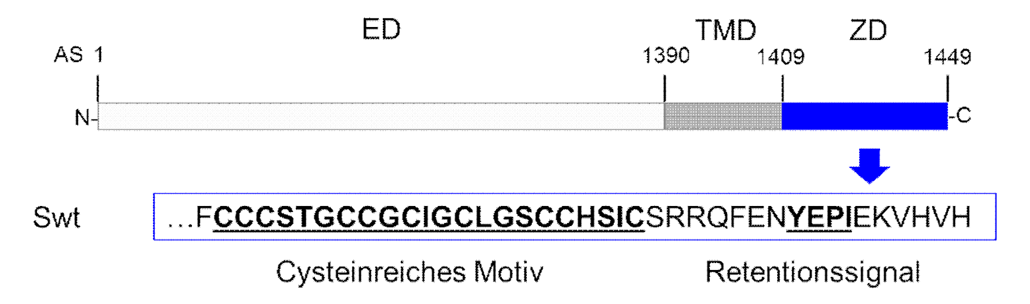


Abb. 4-21 Schematische Darstellung des TGEV S-Wildtypproteins.
ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Wird das Tyrosin innerhalb dieses Signals zu Alanin mutiert (Abb. 4-22) wird das Retentionssignal zerstört und die Mutante wird an der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 4-26, Bild B).

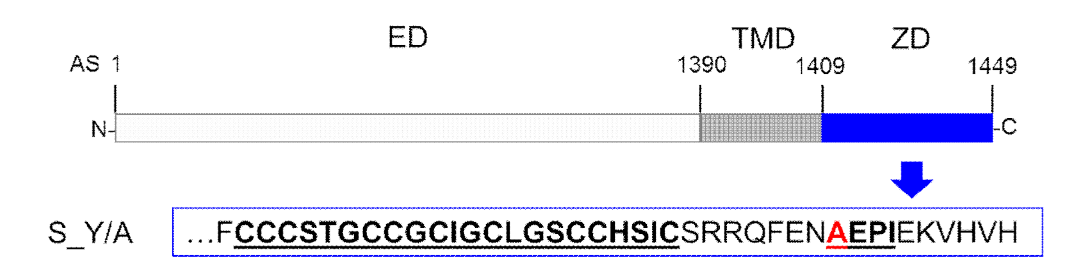


Abb. 4-22 Schematische Darstellung der TGEV S_Y/A-Mutante.
Die substituierte Aminosäure ist in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Findet eine Mutation zwei Aminosäurepositionen nach dem Retentionssignal statt, so dass das Lysin durch Methionin substituiert wird (Abb. 4-23), wird das Retentionssignal in ein Endozytosesignal umgewandelt. Die S_K/M-Mutante wird an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 4-26, Bild C) und anschließend wieder endozytiert.

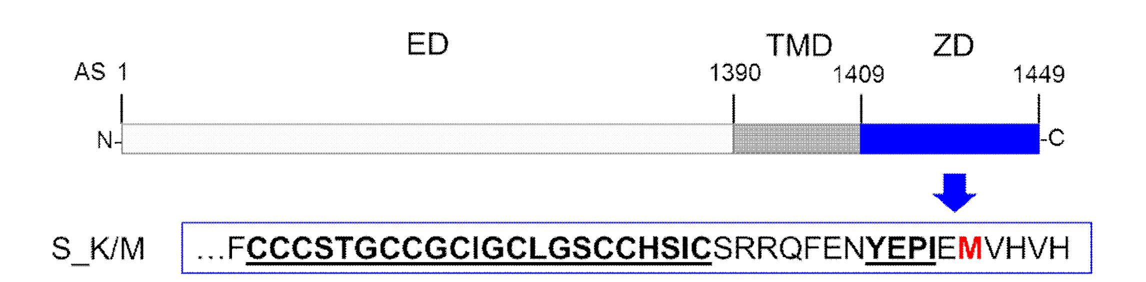


Abb. 4-23 Schematische Darstellung der TGEV S_K/M-Mutante.
Substituierte Aminosäure ist in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

4.3.1.1 Die S_Y/A- und S_K/M-Mutanten kolokalisieren mit dem M-Protein

Mit Hilfe der folgenden Experimente wurde die Bedeutung des tyrosinbasierten Retentionssignals des S-Proteins für die Interaktion mit dem TGEV M-Protein untersucht. Dazu wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (s. Kapitel 3.6.1). BHK 21-Zellen wurden mit cDNAs codierend für TGEV Swt, S_Y/A und S_K/M mi

t dem TGEV MHA-Protein koexprimiert. Das TGEV M-Protein wurde C-Terminal mit einem HA-Peptid (Sequenz siehe Anhang) fusioniert, um die Detektion in der IFA mittels HA-Antikörper (aus Spezies Kaninchen) durchführen zu können (Abb. 4-24). Dies war wichtig, um Kreuzreaktionen zwischen dem anti-TGEV-S (aus Spezies Maus) und dem anti-TGEV-M Antikörper (aus Spezies Maus) zu verhindern.

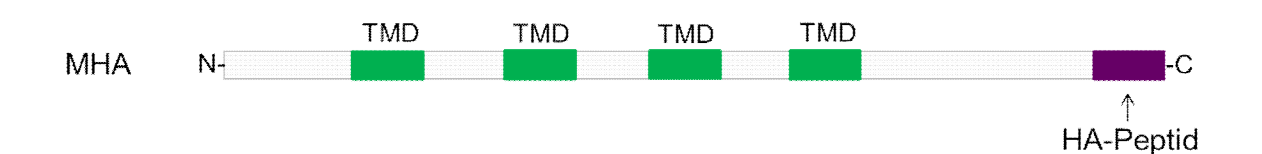


Abb. 4-24 Schematische Darstellung des mit HA-Peptid C-terminal-fusionierten TGEV M-Proteins.
TMD: Transmembrandomäne.

Die Detektion des S-und M-Proteins erfolgten intrazellulär nach einer Membranpermeabilisierung (+ Triton). Die Ergebnisse des Einzelexpressionsanalysen zeigten, dass das Swt-Protein und die S-K/M-Mutante intrazellulär in einer perinukleären Region lokalisiert waren (Abb. 4-25, Bilder A und C). Wobei zu beobachten war, dass die S_K/M-Mutante vesikuläre Strukturen zeigte im Vergleich zu dem authentischen S-Protein. Die S_Y/A-Mutante hingegen wies eine Verteilung im kompletten Zytoplasma auf (Abb. 4-25, Bild B).

In Koexpression mit dem TGEV MHA-Protein konnte gezeigt werden, dass das Swt-Protein, die S_Y/A- und ebenfalls die S_K/M-Mutante mit dem MHA-Protein kolokalisierten (Abb. 4-25, Bilder K, L und M). Außerdem war sichtbar, dass sich die intrazelluläre Verteilung von S_Y/A in Koexpression mit dem MHA-Protein veränderte. In Einzelexpression wurde diese Mutante im kompletten Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4-25, Bild B) und zusammen mit dem MHA-Protein konnte diese Mutante ebenfalls wie das Wildtypprotein in einer perinukleären Region detektiert werden (Abb. 4-25, Bild E).

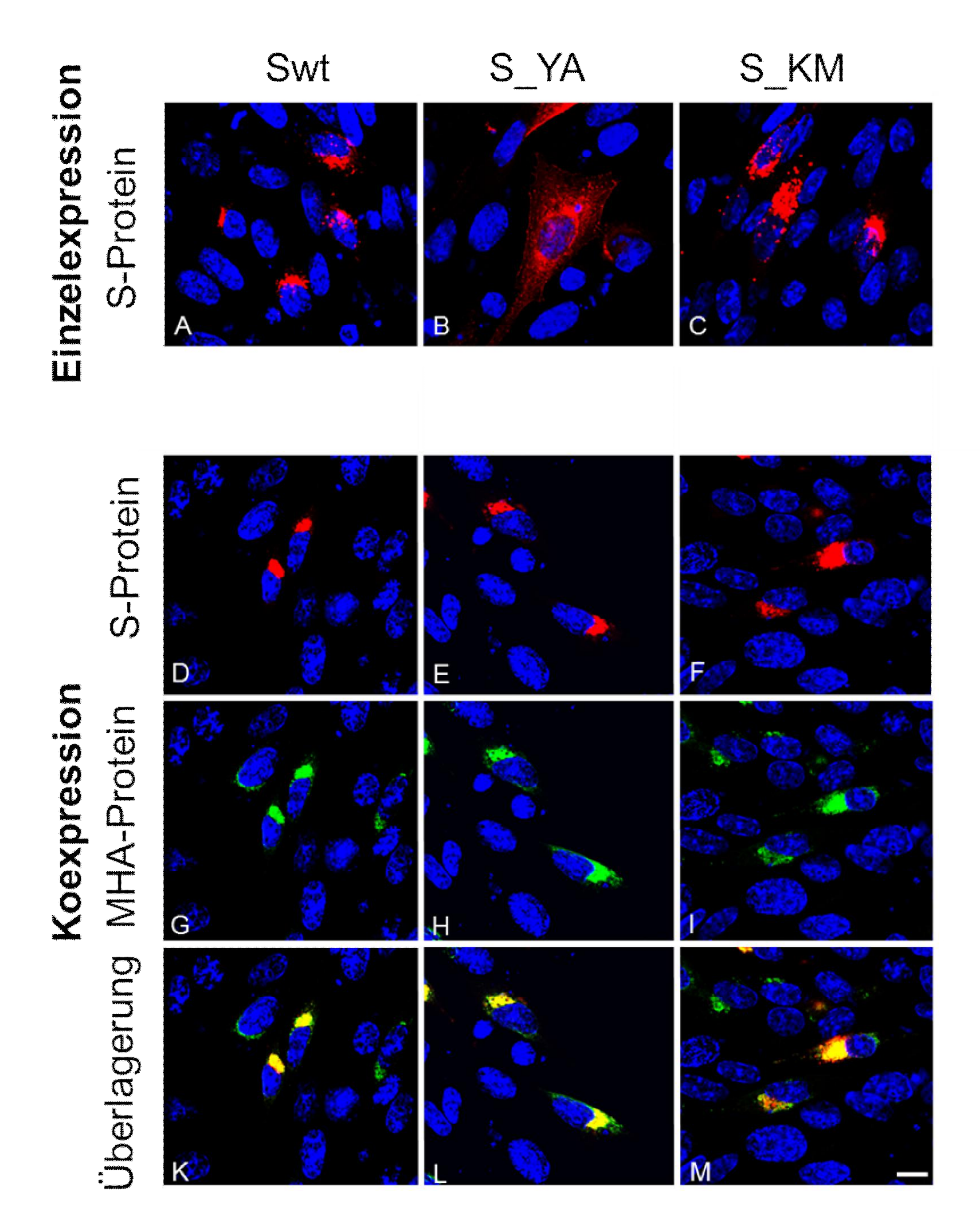


Abb. 4-25 Immunfluoreszenzanalyse mittels Konfokalmikroskopie der TGEV Swt-, S_Y/A- und S_K/M-Proteine in Einzelexpression bzw in Koexpression mit dem MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach Membranpermeabilisierung mit Triton.Maßstab: 10 µm

4.3.1.2 Die S_Y/A- und S_K/M-Mutanten werden durch das M-Protein intrazellulär zurückgehalten

Die S_Y/A-Mutante und die S_K/M-Mutante konnten in Einzelexpression auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4-26, Bilder B und C). Das S-Wildtypprotein wurde durch das intakte Retentionssignal intrazellulär zurückgehalten und konnte dementsprechend nicht auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4-26, Bild A).

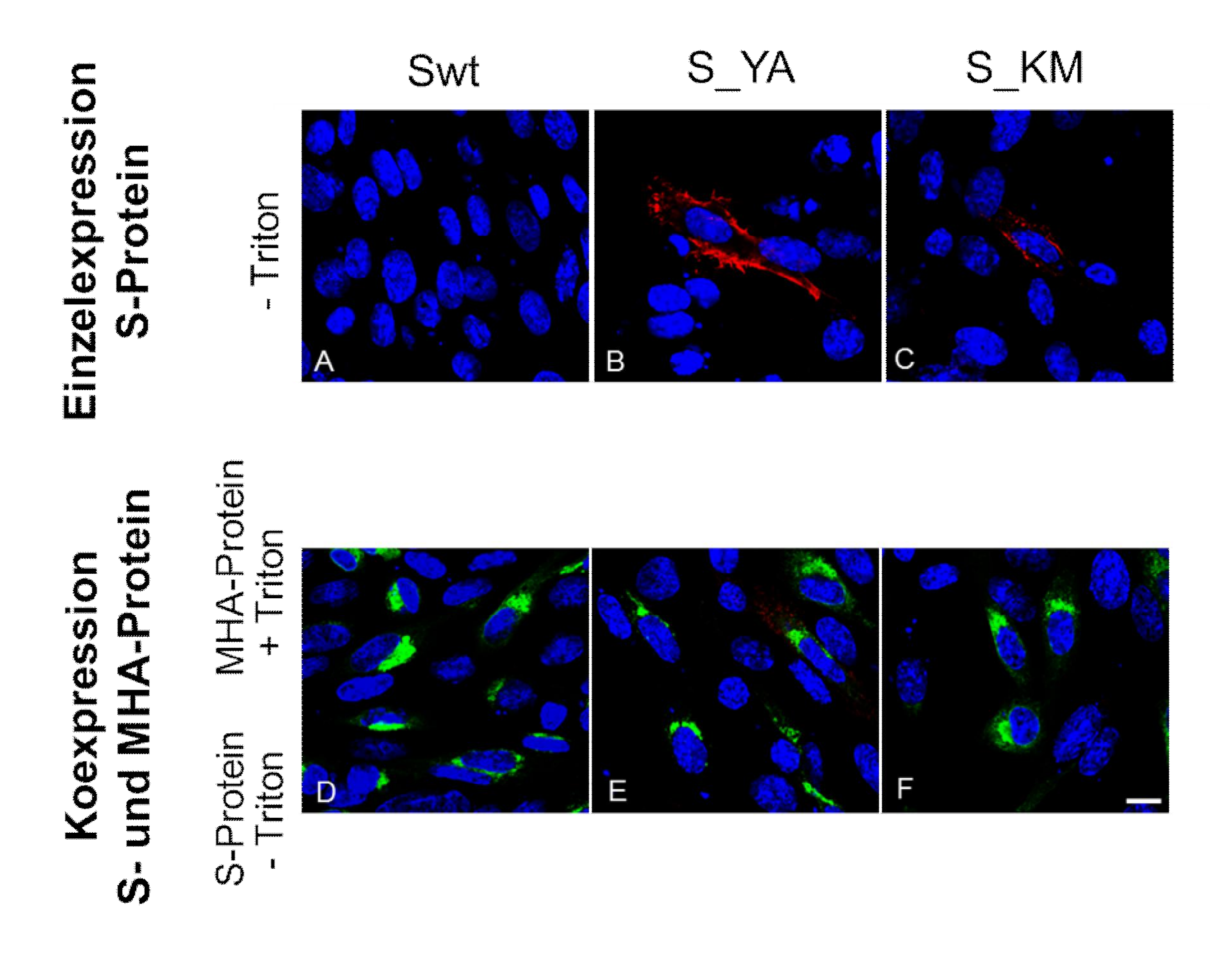


Abb. 4-26 Immunfluoreszenzanalyse mittels Konfokalmikroskopie der TGEV Swt-, S_Y/A- und S_K/M-Proteine in Einzelexpression bzw in Koexpression mit dem MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die intrazelluläre Lokalisation des MHA-Proteins erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach Membranpermeabilisierung mit Triton (+Triton). Die Detektion des S-Proteins auf der Zelloberfläche ohne Membranpermeabilisierung vor Antikörperbehandlung (-Triton). Maßstab: 10 µm

In Koexpression mit dem MHA-Protein konnte nur ein schwaches S-Proteinsignal auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abb. 4-26, Bild E). Die S_Y/A-Mutante wurde durch Koexpression des MHA-Proteins intrazellulär zurückgehalten. Für die S_K/M-Mutante konnte ein ähnliches Ergebnis, wie für die S_Y/A-Mutante beobachtet werden. In Koexpression mit dem MHA-Protein konnte kein S-Protein auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 4-26, Bild F).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die S_Y/A und die S_K/M-Mutante in der Lage waren mit dem MHA-Protein zu interagieren.

4.3.2 Hat das CRM des S-Proteins eine Bedeutung bei der S-M-Proteininteraktion?

Die in Kapitel 4.4 beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass das Fehlen aller Cysteine im membrannahen Abschnitt des TGEV S-Proteins dazu führte, dass das S-Protein nicht in VLPs eingebaut werden konnte. Da die Bedingungen für den S-Proteineinbau in VLPs und die direkte S-M-Proteininteraktion variieren können, wurde die Bedeutung des CRM für die S-M-Proteininteraktion untersucht.

4.3.2.1 Das CRM des S-Proteins bestimmt nicht die intrazelluläre Verteilung des S-Proteins in Koexpression mit dem M-Protein

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen (IFA) wurde die Bedeutung des CRM für die Interaktion mit dem M-Protein untersucht (s. Kapitel 3.6.1). Die S-M-Proteininteraktion wurde in diesen Versuchen mit den gleichen Cys-Mutanten, und S-Chimären untersucht, jedoch war das tyrosinbasierte Retentionssignal (YEPI) durch die Mutation Y/A zerstört (Abb. 4-27 und 4-28).

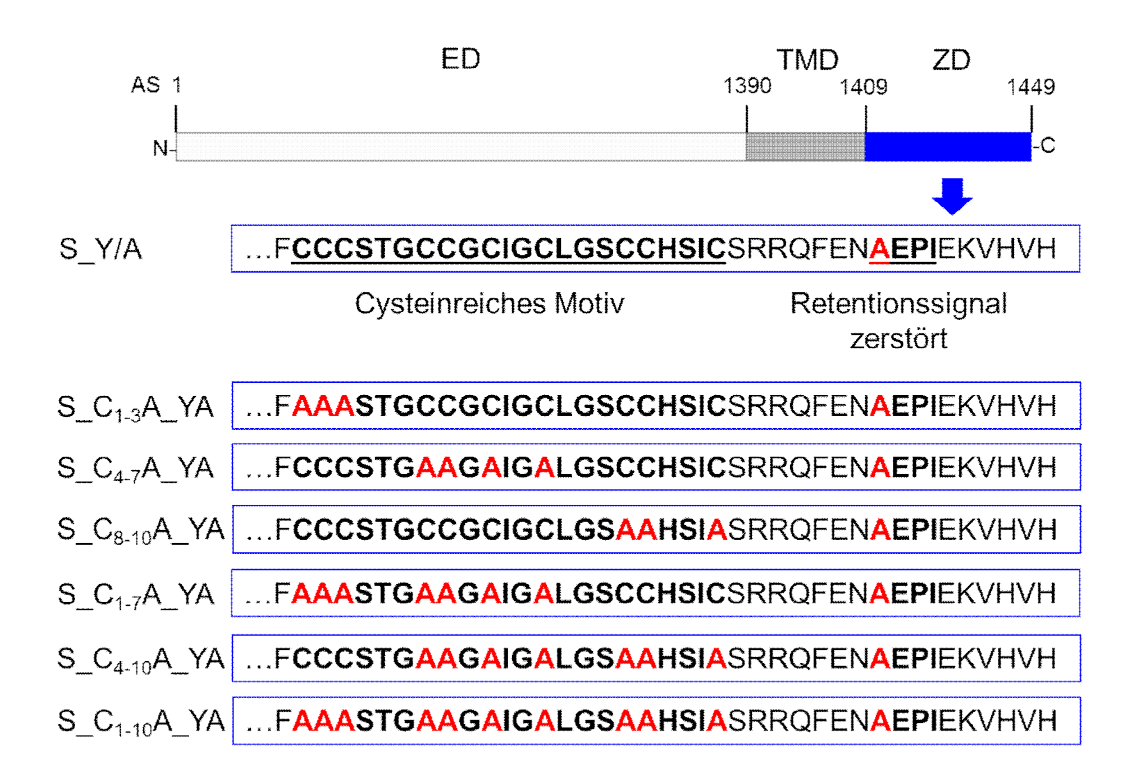


Abb. 4-27 Schematische Darstellung der TGEV S-Y/A-Mutante und der TGEV S-Cysteinmutanten mit Y/A-Mutation.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Diese Mutation war nötig, um den Transport der Mutanten an die Zelloberfläche zu gewährleisten, damit durch eine mögliche Interaktion mit dem MHA-Protein die Lokalisation des S-Proteins beeinflusst werden konnte. Da die S-Y/A-Mutante noch in der Lage war, mit dem MHA-Protein zu interagieren (siehe Kapitel 4.3.1) konnten somit Rückschlüsse auf die Bedeutung des CRM gezogen werden.

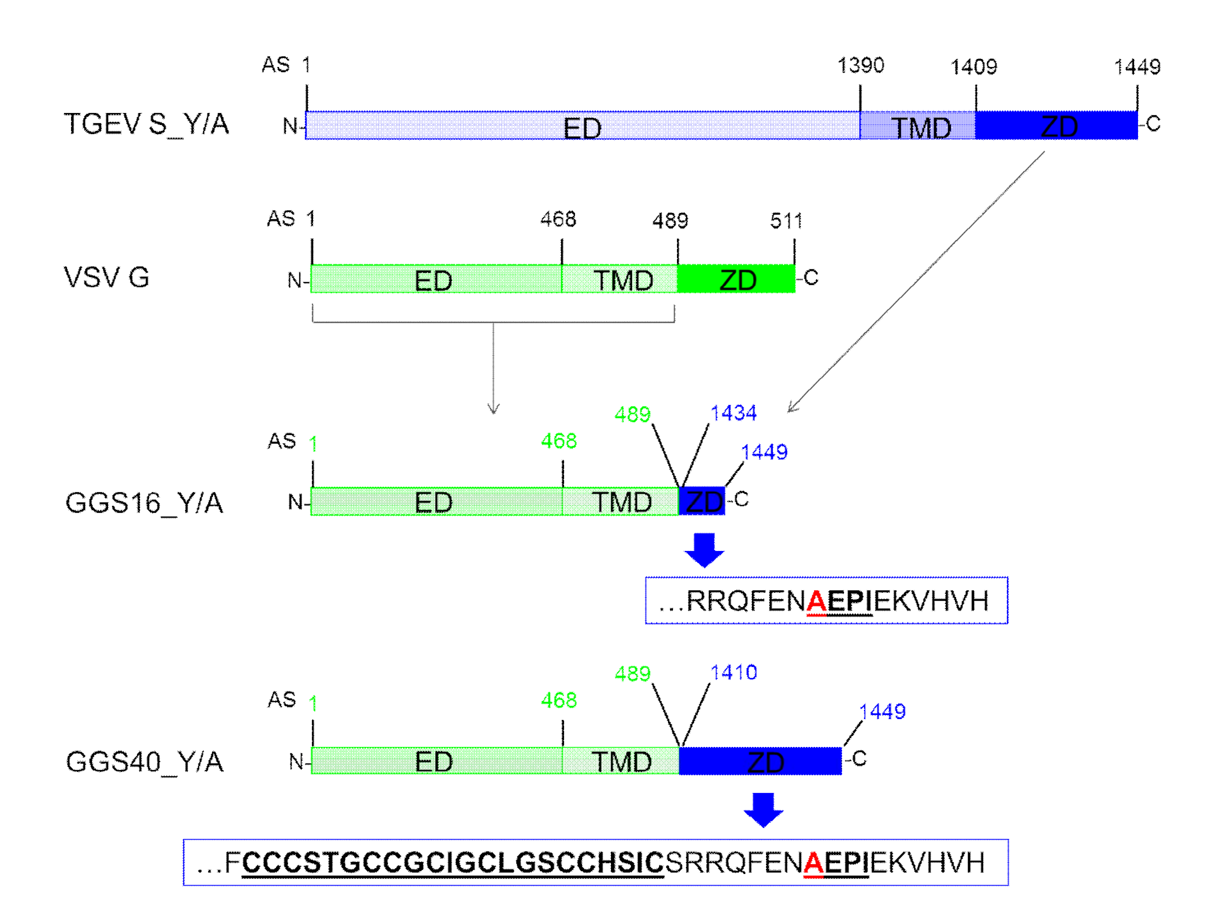


Abb. 4-28 Schematische Darstellung der TGEV/VSV-S/G-Proteinchimären mit Y/A-Mutation (rotmarkierte Aminosäure). Blaue Proteindomänen: TGEV S-Protein. Grüne Proteindomänen: VSV G-Protein. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne. Unterstrichene Aminosäurensequenzen zeigen die cysteinreiche Region bzw. das Retentionssignal der ZD des TGEV S-Proteins an.

Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Mutanten wurde S-Deletionsmutanten untersucht. Bei diesen Deletionsmutanten fehlen entsprechend die letzten 26 (S_del26) oder die letzten 35 (S_del35) Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne des S-Proteins (Abb. 4-29).

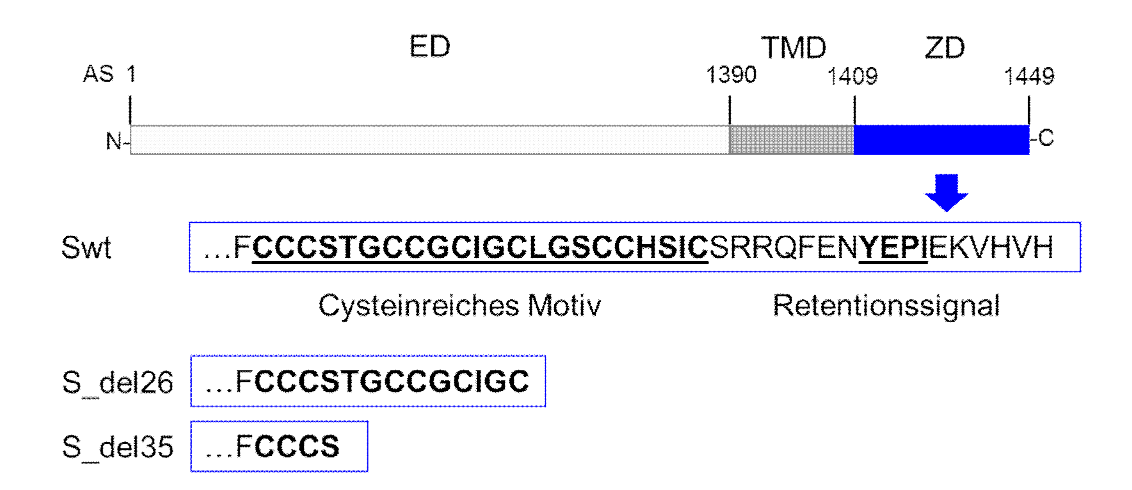


Abb. 4-29 Schematische Darstellung der TGEV S-Deletionsmutanten.
ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne. Hellgrau unterlegte Aminosäuren zeigen deletierten Bereich der ZD an. Unterstrichene Aminosäurensequenzen zeigen das cysteinreiche Motiv bzw. das Retentionssignal der ZD des TGEV S-Proteins an.

Betrachtet man die Ergebnisse der Cys-Y/A-Mutanten in der Abbildung 4-30 so war zu erkennen, dass alle getesteten Cys-Mutanten in Einzelexpression (Abb. 4-30, Bilder A-G) eine Lokalisation im ganzen Zytoplasma aufwiesen. Ist jedoch das MHA-Protein koexprimiert (Abb. 4-30, O-U) so verändert sich auch bei den Cys-Y/A-Mutanten, das Lokalisationsmuster, und die Proteine werden in einem perinukleären Bereich der Zelle akkumuliert (Abb. 4-30, Bilder H-N).

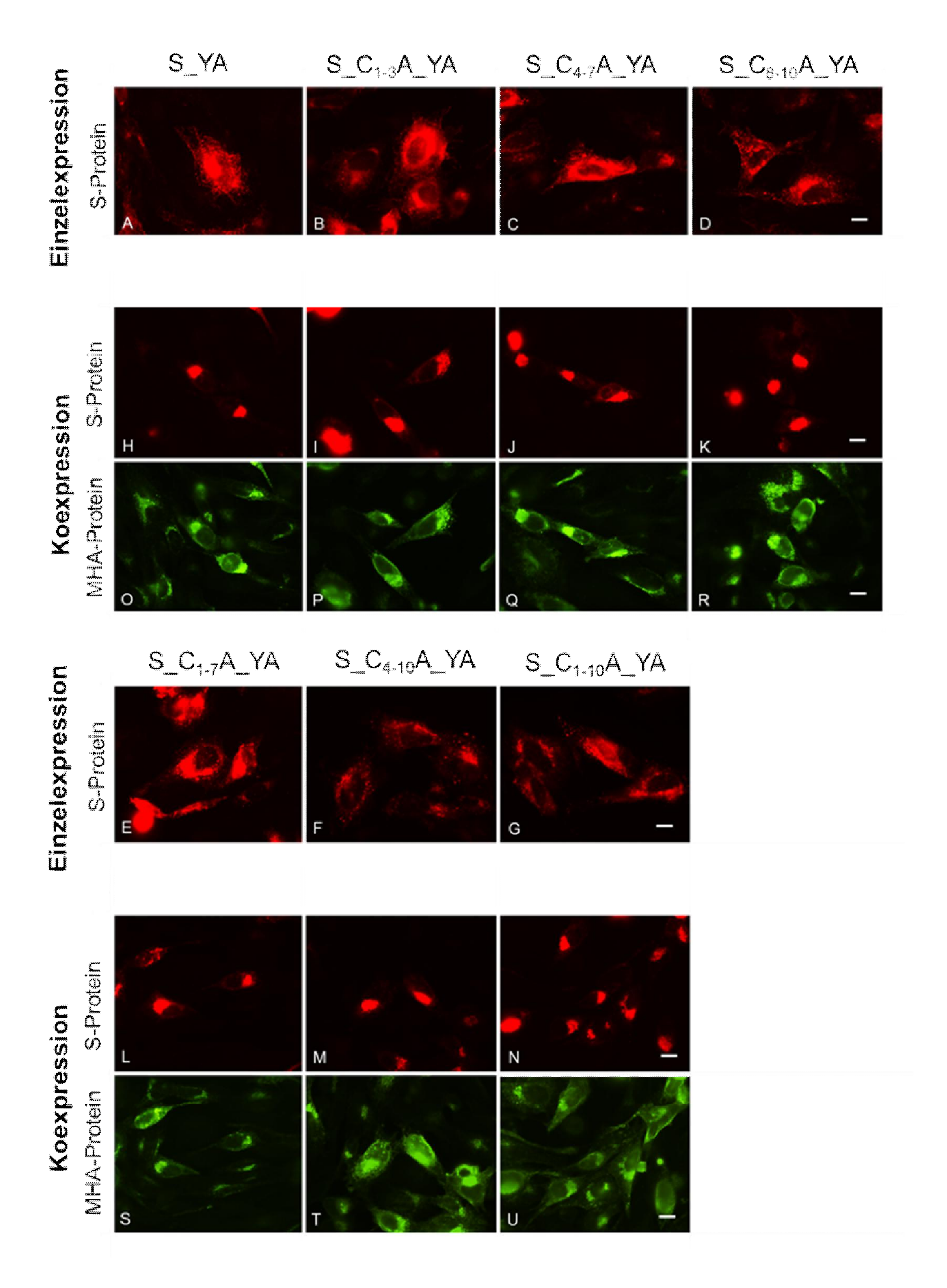


Abb. 4-30 Immunfluoreszenzanalyse des TGEV S-Wildtypproteins (Swt) und der TGEV S-Cysteinmutanten in Einzelexpression bzw. in Koexpression mit dem TGEV MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S-Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI): blau. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung mit Triton. Maßstab: 10 µm.

Ebenfalls konnte für die Deletionsmutanten S_del26 und S_del35 die Veränderung des intrazellulären Expressionsmusters in MHA-koexprimierten Zellen beobachtet werden (Abb. 4-31, Bilder C und D).

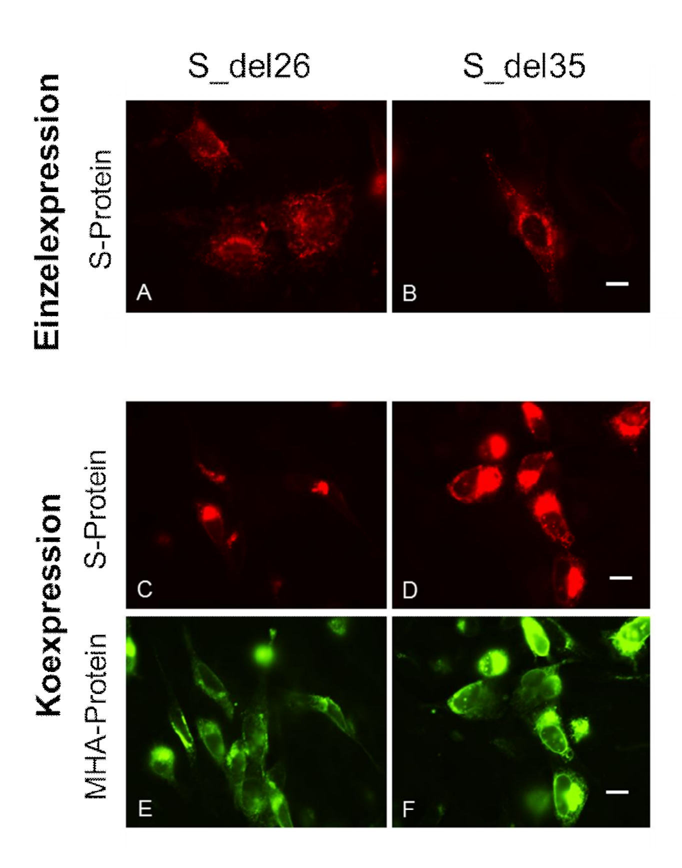


Abb. 4-31 Immunfluoreszenzanalyse der TGEV S-Deletionsmutanten in Einzelexpression bzw. in Ko-Expression mit dem TGEV MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S-Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI): blau. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung mit Triton. Maßstab: 10 µm.

Die S-Chimären zeigten jedoch ein anderes Verhalten. Die beiden GGS_Y/A-Chimären, zeigten sowohl in Einzelexpression als auch in Koexpression mit dem MHA-Protein eine gleiche intrazelluläre Lokalisation (Abb. 4-32, Bild C und D). Sie waren beide, wie in Einzelexpression (Abb. 4-32, Bild A und B) im ganzen Zytoplasma zu detektieren.

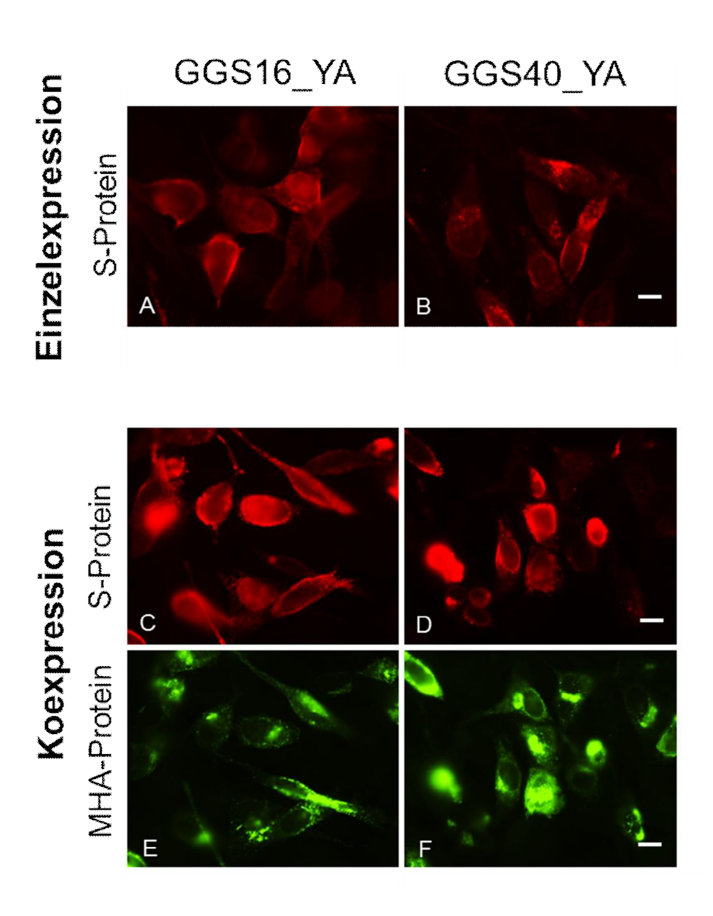


Abb. 4-32 Immunfluoreszenzanalyse der TGEV/VSV-S/G-Chimären in Einzelexpression bzw. in Koexpression mit dem TGEV MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S-Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI): blau. Die intrazelluläre Lokalisation der Proteine erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach einer Membranpermeabilisierung mit Triton. Maßstab: 10 µm.

4.3.2.2 Die intrazelluläre Retention des S-Proteins durch das M-Protein ist unabhängig vom CRM

Die S_Y/A-Mutante besitzt das Potential durch die Koexpression mit dem MHA-Protein intrazellulär zurückgehalten zu werden. In S- und M-Protein koexprimierenden Zellen konnte die S_Y/A-Mutante nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Abb. 4-33, Bild H). Die TGEV Cys-Mutanten (S_$C_{1\text{-}3}$A_Y/A, S_$C_{4\text{-}7}$A_Y/A, S_$C_{8\text{-}10}$A_Y/A, S_$C_{1\text{-}7}$A_Y/A, S_$C_{4\text{-}10}$A_Y/A, S_$C_{1\text{-}10}$A_Y/A) bei denen das Retentionssignal (YEPI) zerstört ist, wurden in Einzelexpression auf der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4-33, Bilder B-G). Alle Cys-Mutanten, auch die volle Cys-

Mutante S_$C_{1\text{-}10}$A_Y/A zeigte ebenfalls, wie die S_Y/A-Mutante, eine intrazelluläre Retention in MHA-koexprimierenden Zellen (Abb. 4-33, Bilder I-O).

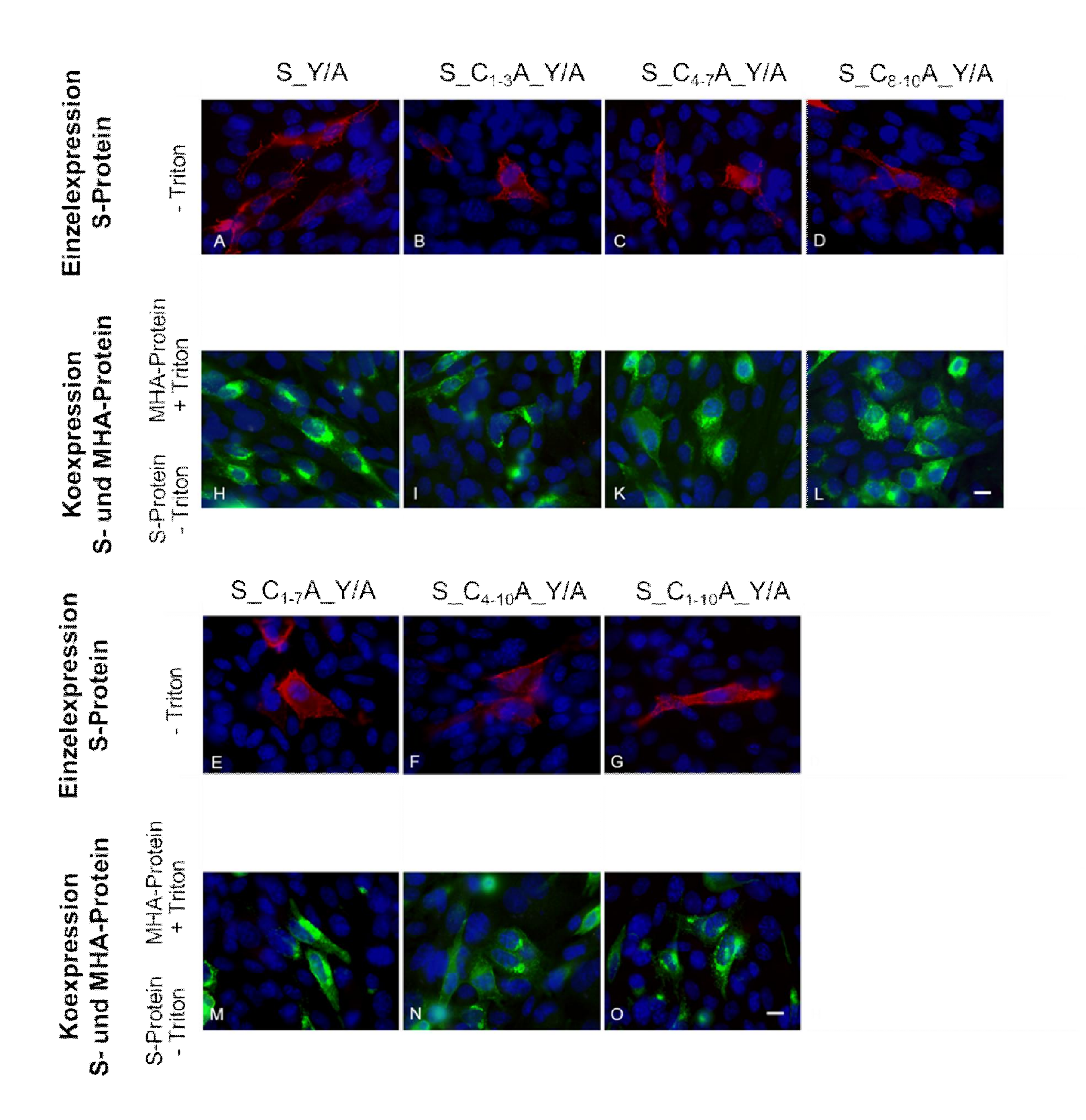


Abb. 4-33 Immunfluoreszenzanalyse der TGEV S_Y/A- und S-Cysteinmutanten mit Y/A-Mutation in Einzelexpression bzw in Koexpression mit dem MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die intrazelluläre Lokalisation des MHA-Proteins erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach Membranpermeabilisierung mit Triton (+Triton). Die Detektion des S-Proteins auf der Zelloberfläche ohne Membranpermeabilisierung vor der Antikörperbehandlung (-Triton). Maßstab: 10 µm.

Die TGEV S-Deletionsmutanten S_del26 und S_del35 zeigten ebenfalls eine Lokalisation auf der Zelloberfläche in Einzelexpression (Abb. 4-34, Bilder A und B).

Durch das gleichzeitige Vorhandensein des MHA-Proteins konnten auch diese Deletionsmutanten nicht mehr auf der Plasmamembran detektiert werden (Abb. 4-34, Bilder C und D).

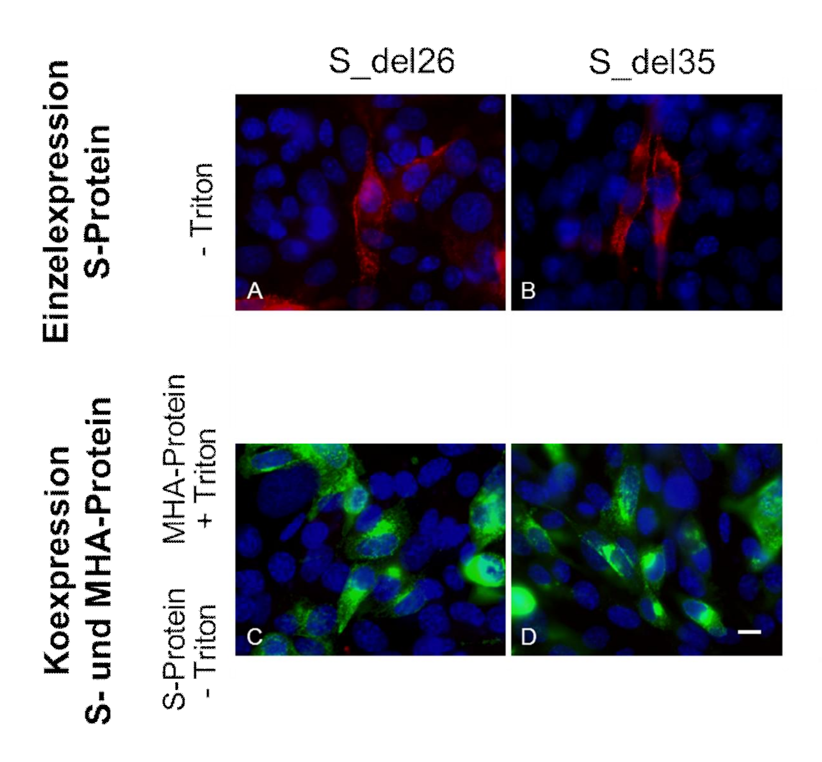


Abb. 4-34 Immunfluoreszenzanalyse der TGEV S-Deletionsmutanten in Einzelexpression bzw. in Koexpression mit dem MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die intrazelluläre Lokalisation des MHA-Proteins erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach Membranpermeabilisierung mit Triton (+Triton). Die Detektion des S-Proteins auf der Zelloberfläche ohne Membranpermeabilisierung vor der Antikörperbehandlung (-Triton). Maßstab: 10 µm.

Die GGS16_Y/A-Chimäre zeigte in Einzelexpression ein anderes Verteilungsmuster an der Zelloberfläche als die GGS40_Y/A-Chimäre. GGS16_Y/A konnte eher in einem pünktchenförmigen Muster auf der Zelloberfläche lokalisiert werden (Abb. 3-35, Bild A) wohingegen GGS40_Y/A eine gleichmäßige Verteilung auf der Zelloberfläche, ähnlich wie die übrigen Y/A-Mutanten, zeigte (Abb. 4-35, Bild B). In Koexpression mit dem MHA-Protein konnten beide Chimären nicht intrazellulär zurückgehalten werden (Abb. 4-35, Bild C und D).

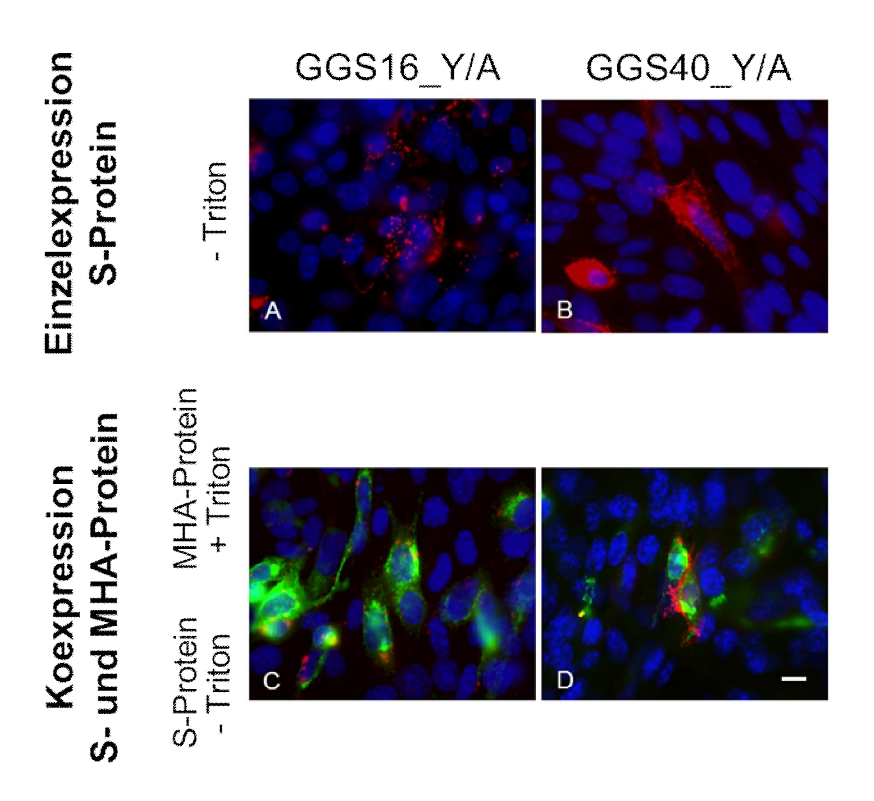


Abb. 4-35 Immunfluoreszenzanalyse der TGEV/VSV-S/G-Chimären mit Y/A-Mutation in Einzelexpression bzw in Koexpression mit dem MHA-Protein.
Die Detektion des TGEV S-Proteins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 6A.C3 (aus Maus). Die Detektion des M-Proteins erfolgte über die Verwendung eines Antikörpers (aus Kaninchen) gegen das HA-Peptid und sekundären Antikörpern (S-Protein: anti-Maus-Cy3, M-Protein: anti-Kaninchen-FITC). S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die intrazelluläre Lokalisation des MHA-Proteins erfolgte durch die Antikörperbehandlung nach Membranpermeabilisierung mit Triton (+Triton). Die Detektion des S-Proteins auf der Zelloberfläche ohne Membranpermeabilisierung vor der Antikörperbehandlung (-Triton). Maßstab: 10 µm.

4.3.3 Antikörperkontrollen zur Immunfluoreszenzanalyse

Um unspezifische Bindungen der Antikörper in den Immunfluoreszenzanalysen auszuschließen wurden Erst- und Zweitantikörperkontrollen durchgeführt (Abb. 4-36 und 4-37). Es zeigten sich keine unspezifischen Bindungen der Antikörper während der Inkubationen.

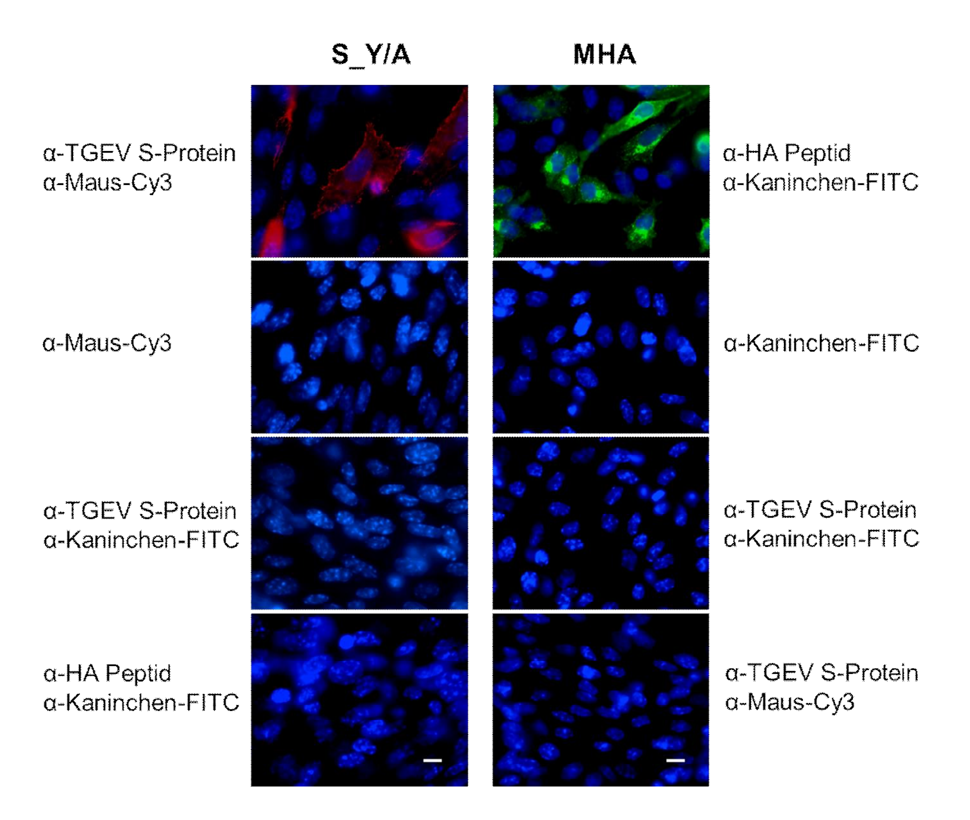


Abb. 4-36 Immunfluoreszenzanalyse der Antikörperkontrollen der mit TGEV S_Y/A- und MHA-Protein transfizierten Zellen.
S Protein: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte stehts nach einer Membranpermeabilisierung mit Triton. Maßstab: 10 µm.

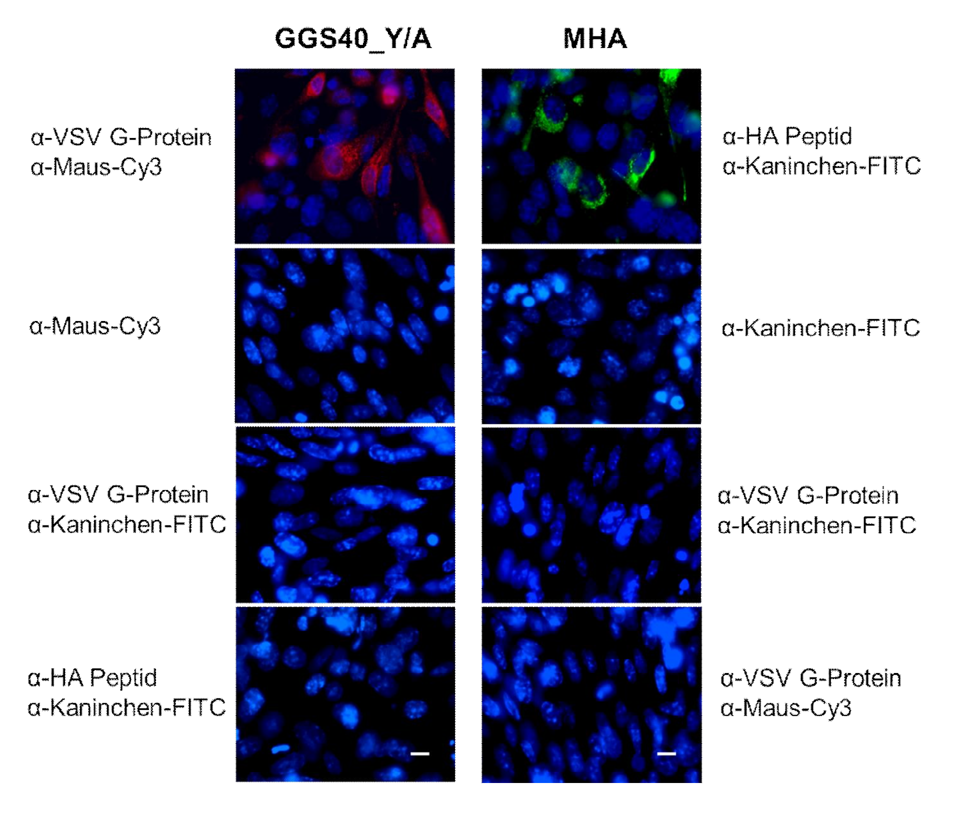


Abb. 4-37 Immunfluoreszenzanalyse der Antikörperkontrollen der mit TGEV/VSV-S/G-Chimären GGS40_Y/A und MHA-Protein transfizierten Zellen.
GGS40_Y/A: rot. MHA-Protein: grün. Die Zellkerne (DAPI-Färbung): blau. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte stehts nach einer Membranpermeabilisierung mit Triton. Maßstab: 10 µm.

4.3.4 Die Koexpression des M-Proteins bestimmt das Glykosylierungsmuster der TGEV S-Cystein-Mutanten

Die in Kapitel 4.3.2 durchgeführten S- und M-Proteininteraktionsuntersuchungen per Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurden mit dem HA-fusionierten TGEV M-Protein durchgeführt. Die IFAs konnten nicht mit dem authentischen TGEV M-Protein durchgeführt werden, da nur ein Antikörper gegen dieses Protein vorlag, der ebenfalls aus der Spezies Maus stammte wie der Antikörper gegen das S-Protein. Um jedoch auch die Interaktion der verschiedenen Cys-Mutanten mit dem authentischen TGEV M-Protein zu untersuchen, wurde das Glykosylierungsmuster der S-Proteinmutanten im Westernblot analysiert.

Glykoproteine, die den Golgi-Apparat durchlaufen, werden komplex glykosyliert. Proteine, die hingegen im ER bzw. ERGIC verbleiben, werden nicht komplex glykosyliert und verbleiben mit den mannosereichen Oligosaccharidketten in diesen Kompartimenten. Stark glykosylierte Proteine zeigen ein langsameres Wanderungsverhalten in einer SDS-PAGE als mannosereiche-Formen des gleichen Proteins. Bei diesem Experiment wurde ausgenutzt, dass die S_Y/A-Mutante in Einzelexpression eine Doppelbande in den Westernblots zeigte (Abb. 4-39, Bild A). Da diese Mutante in den IFAs intrazellulär und auf der Zelloberfläche zu detektieren war, wurde gefolgert, dass es sich um eine komplex glykosylierte und eine Mannose-reiche Form des Proteins handelte. In Koexpression mit dem M-Protein (Abb. 4-39, Bild B) war nur noch eine Bande in den Blots zu erkennen, die der Höhe der Mannose-reichen Form entsprach (Abb. 4-39, Bild A).

Es sollte untersucht werden, ob die Cys-Mutanten mit Y/A-Mutation ebenfalls in Koexpression mit dem M-Protein eine Verschiebung in ihrem Glykosylierungsmuster zeigen.Dazu wurden BHK 21-Zellen mit der S_Y/A-Mutante und den Cysteinmutanten mit Y/A-Mutation (Abb. 4-38) und dem TGEV M-Protein bzw. leerem Vektor (p) kotransfiziert. Die Zellen wurden lysiert und mittels SDS-PAGE separiert. Anschließend erfolgte ein Westernblot und die Detektion der Proteine mittels Antikörper gegen das TGEV S und M-Protein (s. Kapitel 3.6.2).

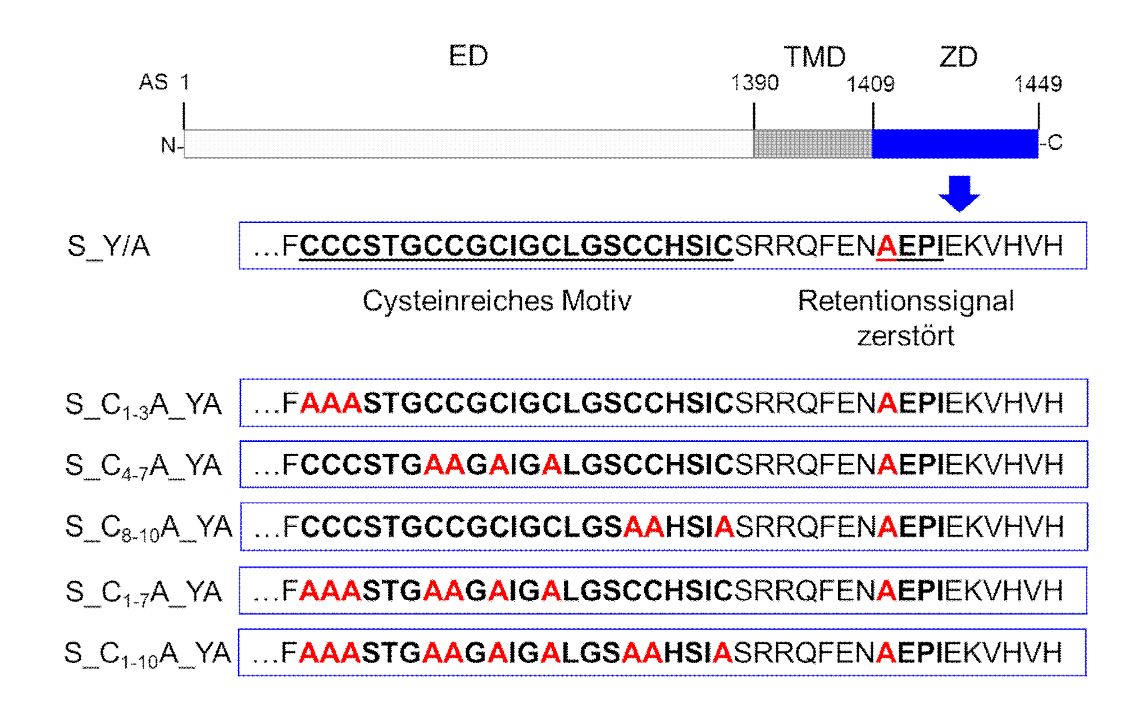


Abb. 4-38 Schematische Darstellung der TGEV S-Y/A-Mutante und der TGEV S-Cysteinmutanten mit Y/A-Mutation.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Betrachtet man die Ergebnisse der partiellen Cysteinmutanten_Y/A (Abb. 4-39, Bild A) so ließ sich sagen, dass jede Cys-Mutante in Einzelexpression eine Doppelbande, wie die S_Y/A-Mutante, aufwies. Ist das TGEV M-Protein jedoch koexprimiert (Abb. 4-39, Bild B) zeigte sich eine Veränderung des Glykosylierungsmusters der Cys-Mutanten. Es war nur noch die Bande der mannosereichen Form der Cys-Mutanten zu sehen.

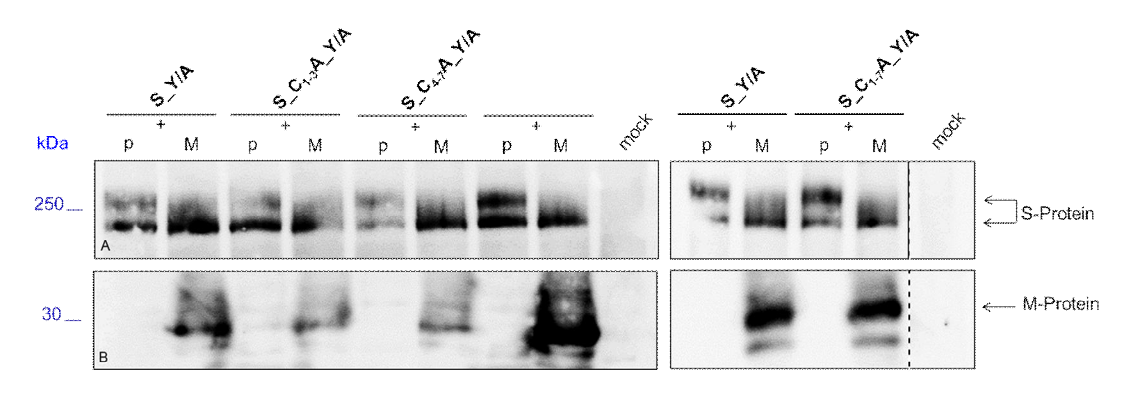


Abb. 4-39 Westernblotanalyse von Zelllysaten. Die Zellen koexprimieren die S-Mutanten mit dem leeren Vektor (Einzelexpression) oder mit dem TGEV M-Protein (M).
Die Zelllysate wurden in einer SDS-PAGE (10%-Trenngel: M-Protein, 8%-Trenngel: S-Protein) aufgetrennt. In der nachfolgenden Westernblotanalyse erfolgte die Detektion des TGEV S- bzw. M-Proteins mit monoklonalen Antikörpern (S-Protein: 6A.C3 (aus Maus), M-Protein: 9D.B4 (aus Maus)) und einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (anti-Maus).

Auch die volle Cys-Mutante S_C_{1-10}A_Y/A zeigte diese Veränderung des Bandenmusters in Koexpression mit dem authentischen M-Protein (Abb. 4-40).

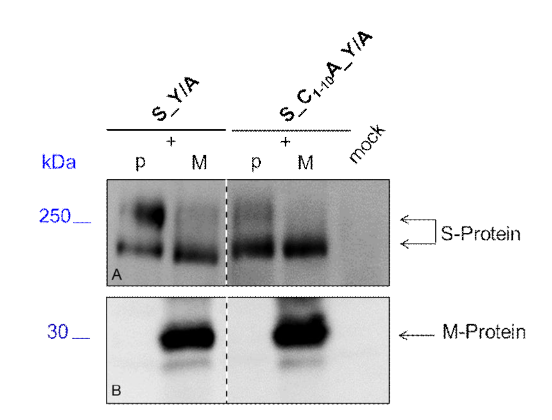


Abb. 4-40 Westernblotanalyse von Zelllysaten. Die Zellen koexprimieren die S-Mutanten mit dem leeren Vektor (Einzelexpression) oder mit dem TGEV M-Protein (M).
Die Zelllysate wurden in einer SDS-PAGE (10%-Trenngel: M-Protein, 8%-Trenngel: S-Protein) aufgetrennt. In der nachfolgenden Westernblotanalyse erfolgte die Detektion des TGEV S- bzw. M-Proteins mit monoklonalen Antikörpern (S-Protein: 6A.C3 (aus Maus), M-Protein: 9D.B4 (aus Maus)) und einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (anti-Maus).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine intrazelluläre Retention aller TGEV S-Cys-Mutanten auch mit dem authentischen TGEV M-Protein möglich war und somit die Ergebnisse der IFA (s. Kapitel 4.3.3) wiederspiegeln.

Um das tatsächliche Glykosylierungsmuster der S_Y/A-Mutante zu bestimmen bedarf es jedoch einer Behandlung mit dem Enzym Endoglycosidase H (Endo H). Dieses Enzym ist in der Lage mannosereiche Oligosaccharide von Glykoproteinen abzuspalten, jedoch nicht fähig komplexe Oligosaccharide von Glykoproteinen zu entfernen. Endo H-sensitive Proteine zeigen eine Bandenverschiebung im Westernblot. In dieser Arbeit wurden mehrere Versuche durchgeführt um eine solche Endo H-Resistenz bzw. -Sensitivität der S-Proteinmutanten zu zeigen. Es sollte dargestellt werden, dass die S_Y/A-Mutanten in Einzelexpression komplex glykosyliert werden, also durch den Golgi-Apparat bis zur Plasmamembran wandern. Weiterhin sollte gezeigt werden, dass die S_Y/A-Mutanten in Koexpression mit dem M-Protein Endo H-sensitiv sind, da sie intrazellulär zurückgehalten werden. Die Etablierung der radioaktiven Markierung des S-Proteins mit ^{35}S-Methionin/Cystein erfolgte in den Zelllysaten sehr gut, jedoch war die S-Proteinbande nach der Endo H-Behandlung in keinem Experiment zu detektieren.

Es wurden unterschiedliche Endo H-Behandlungsprotokolle etabliert, aber kein Versuch war erfolgreich um das S-Protein nach Endo H-Verdau zu detektieren.

4.3.5 Die Koimmunpräzipitation des TGEV S- und M-Proteins

Für die MHV S- und M-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie intrazelluläre Komplexe ausbilden. Die Ausbildung von Proteinkomplexen spricht für eine direkte Protein-Proteininteraktion. Um eine Interaktion zwischen den TGEV S- und M-Proteinen zeigen zu können sollte in dieser Arbeit eine Koimmunpräzipitation (Ko-IP) etabliert werden. Es wurden dazu BHK 21-Zellen mit cDNAs codierend für das S-Protein und für das MHA-Protein entweder ko-transfiziert oder einzeln transfiziert. Nach der Transfektion der Zellen wurde eine Zelllyse durchgeführt und der S-M-Proteinkomplex mit einem Antikörper gegen das S-Protein über Nacht immunpräzipitiert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Detektion erfolgte im Westernblot mit Hilfe eines anti-HA-Peptid-Antikörpers (s. Kapitel 3.6.4). In Abb. 4-41 ist das Ergebnis der Ko-IP zu sehen. In dem mit anti-S-AK immunpräzipitierten S- und MHA-Protein-Ansatz konnte das MHA-Protein detektiert werden. In den Ansätzen in denen nur MHA-, nur Swt oder nur untransfizierte Zellen waren, konnte das MHA-Protein nicht nachgewiesen werden. Dies sprach dafür, dass die S- und MHA-Proteine einen Proteinkomplex ausbildeten, der durch den anti-S-AK immunpräzipitiert werden konnte.

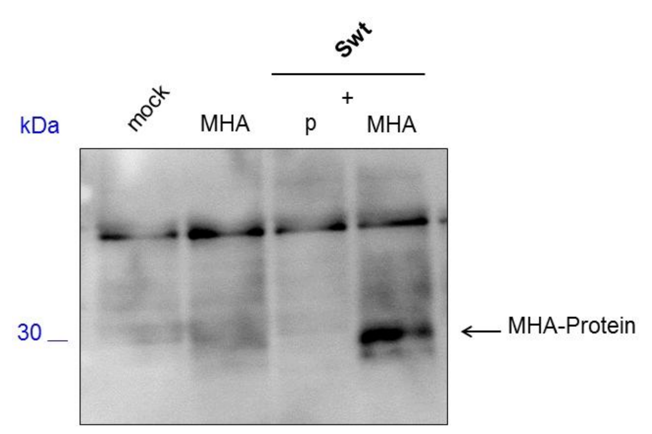


Abb. 4-41 Westernblotanalyse der Koimmunpräzipitation (Ko-IP).
Zellen wurden mit leerem Vektor (mock), MHA-, Swt oder Swt+MHA-Protein codierenden cDNAs transfiziert. Die Zellen wurden lysiert und es erfolgte eine IP über Nacht mit dem monoklonalen AK 6A.C3 gegen das TGEV S-Protein. Die Zelllysate wurden in einer SDS-PAGE (10%-Trenngel) aufgetrennt. In der nachfolgenden Westernblotanalyse erfolgte die Detektion des TGEV MA-Proteins mit einem Anti-HA-Peptid Antikörper (aus Spezies Kaninchen) und einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (anti-Kaninchen).

Leider war es nicht möglich die Ko-IP mehrfach zu reproduzieren, um auch die entsprechenden Cys-Mutanten auf das Potential der Komplexbildung mit dem MHA-Protein zu untersuchen.

4.4 Die TGEV S_C_{1-10}A-Mutante kann Oligomere ausbilden

Mit kontinuierlichen Saccharosegradienten lassen sich Proteine bzw. Proteinkomplexe in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennen. Das Wanderungsverhalten der Proteine wird vor allem durch die Dichte und Größe der Proteine bestimmt. So wandern z.B. oligomere Proteinkomplexe, die auf den Saccharose-Gradienten aufgetragen werden tiefer in ihn hinein. Monomere Proteine hingegen wandern weniger tief den Gradienten ein.

Im Ergebnisteil 4.1.3 waren zusätzlich zu den 250 kDa-großen S-Proteinbanden, hochmolekulare S-Proteinbanden der partiellen TGEV S-Cysteinmutanten zu erkennen gewesen (Abb. 4-7), jedoch nicht bei der S_C_{1-10}A Mutante. Da das S-Wildtypprotein in der Lage ist Trimere auszubilden, wurde untersucht, ob die volle Cys-Mutante, aufgrund des Fehlens der Cysteine in der membranproximalen Region, nicht mehr in der Lage ist oligomere Formen auszubilden.

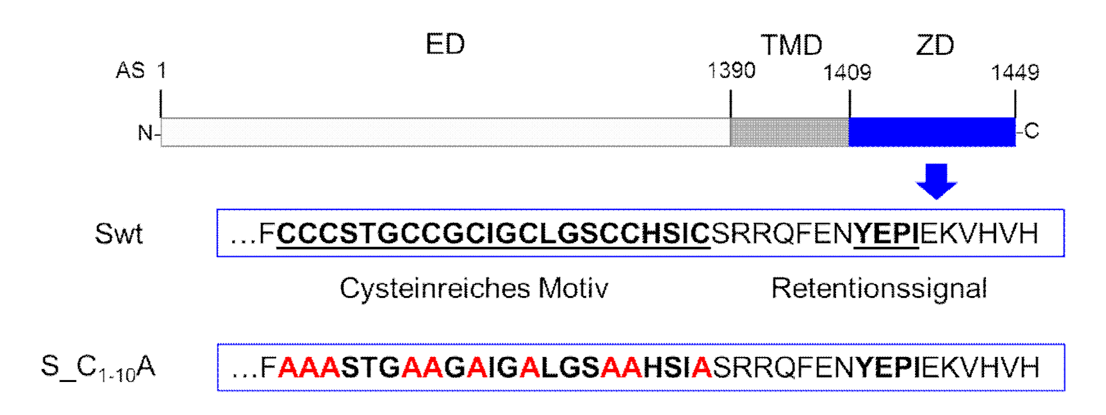


Abb. 4-42 Schematische Darstellung des TGEV S-Wildtyproteins (Swt) und der TGEV S_C_{1-10}A_Y/A-Cysteinmutante.
Substituierte Aminosäuren sind in rot markiert. ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ZD: Zytoplasmastische Domäne.

Dazu wurden BHK 21-Zellen mit cDNAs codierend für TGEV Swt und $S_C_{1-10}A$ transfiziert und mit ^{35}S-Methionin/Cystein-markiert und mit dem besonders milden Detergenz Dodecyl-Maltosid lysiert, um eine Stabilisierung der Oligomere zu gewährleisten (s. Kapitel 3.7.1.2). Diese Zelllysate wurden auf kontinuierliche Saccharose-Gradienten (10-30%-Saccharose-Konzentration) geladen und über Nacht ultrazentrifugiert. Für die Stabilisierung der oligomeren Proteinkomplexe wurde ebenfalls der Puffer des Saccharose-Gradienten mit dem milden Detergenz Dodecyl-Maltosid verwendet. Die zentrifugierten Gradienten wurden fraktioniert und die S-Proteine wurden mittels Immunpräzipitation aus den Fraktionen isoliert. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch eine SDS-PAGE und anschließender Detektion der S-Proteinbanden in einem Phosphoimager (s. Kapitel 3.7.4 und 3.7.5).

Wie in der Abbildung 4-43 zu sehen ist, war das TGEV Swt in tiefere Schichten des Saccharose-Gradienten eingelaufen. Das S-Wildtypprotein ließ sich überwiegend in den Fraktionen 2-7 detektieren, also in Fraktionen mit einer höheren Saccharose-Konzentration von ca. 30-20 %. Die volle Cystein-Mutante $S_C_{1-10}A$ ließ sich ebenfalls überwiegend in den Schichten des Gradienten mit höherer Saccharose-Konzentration (Fraktionen 1-7) nachweisen. Dieses Fraktionierungsmuster ähnelt dem S-Wildtypprotein und spricht dafür, dass die Cystein-Mutante $S_C_{1-10}A$ ebenfalls in der Lage war oligomere Formen auszubilden.

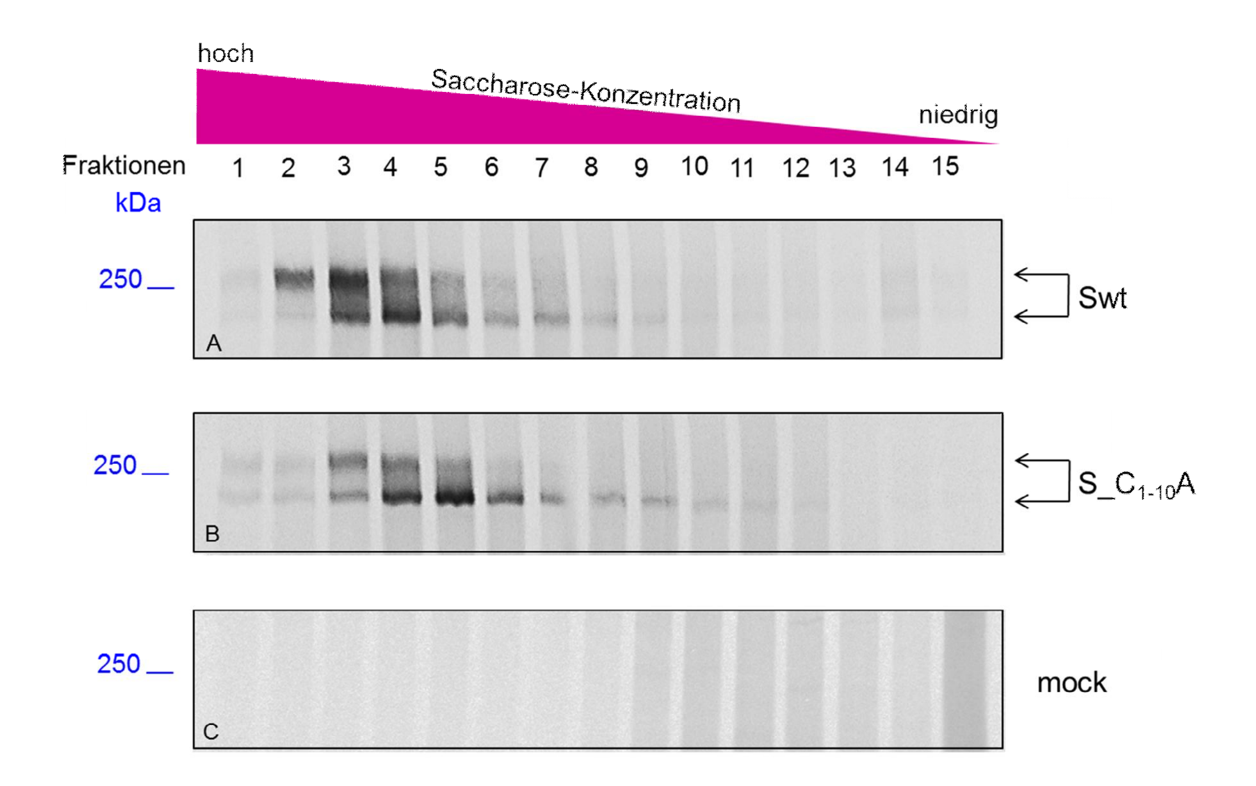


Abb. 4-43 Saccharosegradienten von TGEV S-Wildtypprotein (Swt) und der TGEV S_$C_{1\text{-}10}$A-Mutante.
^{35}S-Methionin/Cystein-markierte Zelllysate von Swt, S_C1-10A und mock (leerer Vektor) exprimierenden Zellen wurden auf kontinuierliche Saccharose-Gradienten (10-30% Saccharose-Konzentration) gelegt und ultrazentrifugiert. Die Gradienten wurden fraktioniert und das S-Protein wurde mittels Immunpräzipitation (IP) isoliert. Die Proben wurden mittels 6%iger-SDS-PAGE separiert und mittels Phosphoimager ausgewertet.

5. Diskussion

5.1 Die Palmitoylierung des TGEV S-Proteins

Palmitoylierung oder S-Acylierung ist die post-translationale Verknüpfung von Fettsäuren, überwiegend Palmitinsäure, an Cysteinseitenketten über eine Thioesterverbindung (Schmidt et al., 1988; Veit et al., 1991). Viele zelluläre und virale Proteine werden palmitoyliert und werden dadurch in ihrer Funktion bestimmt (Kordyukova et al., 2010; Linder und Deschens, 2007; Veit, 2012). So spielt die S-Acylierung von viralen Proteinen z.B. eine wichtige Rolle während des Viruseintritts in eine Wirtszelle oder bei dem Zusammenbau von neuen Viruspartikeln (Veit, 2012). Die S-Acylierung der Proteine erfolgt an Cysteinresten, die sich in der Proteinsequenz des zytoplasmatischen Abschnitts nahe der Transmembrandomäne befinden (Yang und Compans, 1996; Yik und Weigel, 2002). Die coronaviralen S-Proteine besitzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne ein cysteinreiches Motiv (CRM), das eine potentielle Palmitoylierungsstelle präsentiert. Eine Palmitoylierung der SARS-CoV und MHV S-Proteine in Einzelexpression (Bos et al., 1995; Petit et al., 2007) und für das S-Protein in MHV-Partikeln (Sturman et al., 1985) konnte bereits gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde der Palmitoylierungsstatus des TGEV S-Proteins im Viruskontext untersucht und die Ergebnisse zeigten, dass das TGEV S-Protein ebenfalls in Viruspartikeln S-acyliert vorliegt (siehe Kapitel 4.1).

Palmitoylierung kann im kompletten sekretorischen Transportweg, also vom Endoplasmatischen Retikulum (ER), über das Endoplasmatische Retikulum-Golgi-intermediäre Kompartiment (ERGIC) bis zum Golgi-Apparat erfolgen (Ohno et al., 2006). Da der Zusammenbau der Coronaviruspartikel am ERGIC stattfindet (Tooze et al., 1984; Krijnse-Locker et al., 1994) war es wichtig zu überprüfen, ob das S-Protein bereits im ERGIC palmitoyliert vorliegt, um so eine Funktion während des Viruszusammenbaus zu übernehmen.

Um das zelluläre Kompartiment der S-Protein-Palmitoylierung zu entschlüsseln, wurden, das S-Wildtypprotein (Swt) und eine S_Y/A-Mutante auf ihren Palmitoylierungsstatus untersucht. Das S-Wildtypprotein wird durch ein Tyrosin-basiertes Retentionssignal (Yxxθ) am ERGIC, dem Ort des Viruszusammenbaus, zurückgehalten (Paul et al., 2014; Schwegmann-Weßels et al., 2004). Die S_Y/A-Mutante verliert durch die Tyrosin-Substitution am Retentionssignal ihre intrazelluläre Retention und wird auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das Swt-Protein, das intrazellulär zurückgehalten wird, als auch die Y/A-Mutante mit Palmitinsäure markiert werden konnten.

Bei den radioaktiven Markierungen in dieser Arbeit konnte bei dem TGEV S-Wildtypprotein, trotz des intakten Retentionssignals, stets eine Doppelbande in den Fluogrammen detektiert werden. Aufgrund der intrazellulären Retention wurde allerdings nur eine Bande erwartet, da sich dieses Bandenmuster auch in Westernblots zeigte. Die Y/A-Mutante weist aufgrund der Oberflächenexpression eine Doppelbande auf. Diese Doppelbande entspricht einer mannosereichen und einer komplex glykosylierten Form des Proteins. Die Immunpräzipitation (IP) in den radioaktiven Versuchen lässt die Erkennung des Swt-Proteins durch den anti-TGEV S-Antikörper in einer weitaus nativeren Form zu, als das in Westernblots der Fall ist. Es ist möglich, dass so eventuelle intermediäre Glykosylierungs-Formen des S-Proteins erkannt werden, die im ERGIC prozessiert wurden und so zu der Doppelbande des S-Wildtyproteins führten. Eine andere Erklärung könnte auch, die Überexpression mit dem Expressionsplasmid (pCGI) des Swt-Proteins sein. Die zelluläre Maschinerie ist dadurch nicht ausreichend fähig, die exprimierten S-Proteine durch das Tyrosin-basierte Retentionssignal am ERGIC festzuhalten und einige S-Proteine wandern in das Golgi-Kompartiment ein und werden komplex glykosyliert. Durch die Ankonzentration der IP bei den radioaktiven Versuchen werden diese Formen in den Fluogrammen detektiert im Westernblot jedoch nicht. Um diese Erklärungen bestätigen zu können wäre eine Behandlung mit dem Enzym Endoglykosidase H (Endo H) notwendig. Die Endo H-Behandlung wurde in dieser Arbeit versucht zu etablieren, jedoch war aus bisher ungeklärten Gründen das S-Protein nach Durchführung des Protokolls wiederholt nicht mehr nachweisbar. In früheren Experimenten konnte jedoch die Endo H-Sensitivität für das TGEV Swt-Protein bestätigt werden (Schwegmann-Weßels et al., 2004).

Zusammenfassend kann man sagen, dass das TGEV S-Protein in Viruspartikeln palmityliert vorliegt und die Acylierung des S-Proteins bereits im ERGIC erfolgt. Für das SARS-CoV S-Protein ist ebenfalls beschrieben, dass die Palmitoylierung in einem prä-Golgi-Kompartiment erfolgt (McBride und Machamer, 2010). Die Palmitoylierung des TGEV S-Proteins kann so eine Funktion während des Viruspartikelzusammenbaus einnehmen.

5.1.1 Bedeutung der Palmitoylierung des TGEV S-Proteins beim Viruszusammenbau

Coronaviren sind membranumhüllte Viren. In die Membranhülle sind das Membran (M)-, das Envelope- (E) und das Spike (S)-Protein eingelagert. Während des Zusammenbaus neuer Viruspartikel werden diese Strukturproteine durch Protein-Protein-Interaktionen in die neuen Partikel integriert. Dabei ist der Einbau des S-Proteins wichtig für die Bildung von infektiösen Partikeln und spielt daher eine entscheidende Rolle im Replikationszyklus der Viren. Das S-Protein bindet an den zellulären Rezeptor der Wirtszelle und vermittelt die anschließende Fusion der viralen mit der zellulären Membran, um das virale Genom in die Wirtszelle zu schleusen. Befindet sich das S-Protein nicht in den Viruspartikeln oder ist es aus anderen Gründen, z.B. durch Mutationen, nicht voll funktionsfähig, so kann keine erfolgreiche Infektion von Wirtszellen erfolgen. Die Palmitoylierung (S-Acylierung) von viralen Proteinen kann Einflüsse auf die Infektiösität der Viren haben. So ist z.B. bei dem humanen Immundefizienz Virus (Rousso et al., 2000) und dem Influenza H1 (Zurcher et al., 1994) die Palmitoylierung von bestimmten Proteinen für eine Infektion essentiell.

In dieser Doktorarbeit wurde 2-Bromopalmitat (2-BP) zur Inhibierung der S-Acylierung des TGEV S-Proteins während der Virusreplikation genutzt. 2-BP fungiert als ein Palmitinsäureanalog und inhibiert die Palmitylacyltransferasen (PAT)-Aktivität (Webb et al., 2000). Die Hypothese war, dass die Palmitoylierung des S-Proteins wichtig ist, um mit dem M-Protein interagieren zu können und in neue Viruspartikel eingebaut zu werden. Mit TGEV infizierte Zellen wurden dazu mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-BP behandelt und neugebildete infektiö-

se Viruspartikel wurden in ihren Zellkulturüberständen mittels Plaque-Test quantifiziert. Es zeigte sich eine 2-BP dosisabhängige Reduktion der Infektiösität, wobei der Effekt bei einer Konzentration von 8 und 12 µM 2-BP signifikant war (s. Kapitel 4.1.4.2).

Bei der Betrachtung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass 2-BP nicht spezifisch die Palmitoylierung des S-Proteins inhibiert, sondern auch die Acylierung aller anderen viralen und zellulären Proteine beeinflussen kann. Die 2-BP-Behandlung führte jedoch in keiner der untersuchten Konzentrationen zu einem zelltoxischen Effekt (s. Kapitel 4.1.4.1). Das TGEV E-Protein ist auch ein potentieller Kandidat für eine Modifikation mit Palmitinsäuren, wie für andere CoV E-Proteine gezeigt werden konnte (Boscarino et al., 2008; Core et. al., 2002; Lopez et al., 2008). Das E-Protein erfüllt ebenfalls wichtige Funktionen während der Virusreplikation und kann durch eine Inhibierung der Palmitylierung beeinträchtig werden. Für eine konkretere Beurteilung dieser im 2-BP-Plaque-Test gewonnen Ergebnisse ist ein Nachweis von gebildeten Viruspartikeln und die Quantifizierung des S-Protein Einbaus in diesen Viruspartikeln notwendig.

Die Ergebnisse des 2-BP-Plaque-Tests gaben in dieser Arbeit einen ersten Andeutung darauf, dass die Palmitoylierung von viralen Proteinen währen des Zusammenbaus von TGE-Viruspartikeln von Bedeutung ist.

Die Bedeutung der Palmitoylierung der SARS-CoV und MHV S-Proteine während des viralen Replikationszyklus konnte bereits in einigen Studien verdeutlicht werden. Palmitoylierungsdefiziente SARS-CoV S-Mutanten werden nicht in virusähnliche Partikel eingebaut (Ujike et al., 2012) und auch die Behandlung mit 2-BP, führte zur Bildung von MHV-Partikeln ohne eingebautes S-Protein (Thorp et al., 2006). Durch Mutagenesestudien der beiden viralen Proteine wurde versucht die Cystein-Cluster des CRM zu identifizieren, die für den Einbau des S-Proteins in die Partikel verantwortlich sind. Für das SARS-CoV S-Protein sind die beiden äußersten C-terminalen Cysteine in dem CRM essentiell und ausreichend für den Einbau der S-Proteine (Ujike et al., 2012). Für MHV liegen zum S-Einbau mehrere Studien vor, die z.T. unterschiedliche Aussagen machen. Im MHV S-Protein liegen im äußersten C-terminalen Cystein-Cluster drei Cysteinreste vor. Wird ein Cystein-

rest bei rekombinanten MHV substituiert so kommt es zu einem S-Einbau, der vergleichbar ist mit dem S-Wildtypprotein. Werden zwei Cysteine substituiert, wird weniger S-Protein in die Viruspartikel eingebaut. Bei der Substitution aller Cysteine in dem C-terminalen Cystein-Cluster unterbleibt die Bildung von Viruspartikeln vollständig (Shulla und Gallagher, 2009). Eine andere Studie mit MHV VLPs zeigte durch Deletionsmutanten, dass lediglich drei Cysteinreste am äußersten N-terminalen Bereich des zytoplasmatischen Abschnitts in der Nähe der TMD ausreichend sind für den Einbau von S-Protein in VLPs (Bosch et al., 2005). Ye und Kollegen konnten hingegen zeigen, dass mindestens fünf Cysteinreste in dem äußersten N-terminalen Bereich des zytoplasmatischen Abschnitts und auch die C-terminale äußerste Proteinsequenz des zytoplasmatischen Abschnitts notwendig sind, für den Einbau in rekombinante Viren (Ye et al., 2004).

Da unterschiedliche Bedingungen für den Einbau des S-Proteins in den unterschiedlichen Coronavirusspezies existieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Aufgaben das cysteinreiche Motiv während des Viruszusammenbaus in dem *Alphacoronavirus* TGEV einnimmt.

Virusähnliche Partikel (VLPs, *Virus-like particles*) sind Membranvesikel in denen ein oder mehrere virale Strukturproteine eingelagert sind. VLPs sind nicht infektiös, da sie kein virales Genom enthalten und somit nicht replikationsfähig sind. Der Zusammenbau von VLPs mimt die Assemblierung von vollständigen Viruspartikeln nach. VLPs bieten somit die Möglichkeit, die Interaktion von bestimmten viralen Strukturproteinen während des Zusammenbaus von Viruspartikeln näher zu untersuchen. Die Bedingungen für die Bildung von VLPs sind von Virus zu Virus unterschiedlich. Für TGEV ist beschrieben, dass die Koexpression des TGEV Membran (M)- und des Envelope (E)-Proteins ausreichend sind (Baudoux et al., 1998). Das S-Protein ist nicht essentiell für die Ausbildung von VLPs wird jedoch bei Koexpression mit dem E- und dem M-Protein in die VLPs eingebaut (Vennema et al., 1996). Die Cysteinreste des cysteinreichen Motivs (CRM) können in unterschiedliche Cystein-Cluster eingeteilt werden. Bei TGEV erfolgte die Einteilung in dieser Arbeit in drei Cystein-Cluster aus je drei bis vier Cysteinresten. Die Bedeutung des CRM für den Einbau des TGEV S-Proteins in VLPs wurde mit Hilfe unterschiedlicher TGEV S-Cys-Mutanten untersucht. Es wurden partielle Cys-Mutanten herge-

stellt, bei denen verschiedene Cystein-Cluster mit Alaninresten substituiert wurden (S_C_{1-3}A, S_C_{4-7}A, S_C_{8-10}A, S_C_{1-7}A, S_C_{4-10}A). Außerdem wurde eine vollständige Cystein-Mutante hergestellt, bei der die gesamten zehn Cysteinreste im CRM durch Alaninreste ausgetauscht wurden (S_C_{1-10}A). Mit Hilfe des VLP-Assays war es in dieser Arbeit möglich zu zeigen, dass alle partiellen TGEV Cys-Mutanten (S_C_{1-3}A, S_C_{4-7}A, S_C_{8-10}A, S_C_{1-7}A) in der Lage waren in VLPs eingebaut zu werden, jedoch konnte die vollständige Cys-Mutante S_C_{1-10}A nicht in VLPs eingebaut werden (s. Kapitel 4.2.1). Auch die Ergebnisse der VLP-IFA (s. Kapitel 4.2.2) untermauern diese Ergebnisse. Dieser Test wurde als zusätzliche Alternative zu dem VLP-Assay eingeführt. In diesem Test wurde allerdings nicht das Vorhandensein von virusähnlichen Partikeln in Zellkulturüberständen untersucht, sondern vielmehr die Fähigkeit der Cys-Mutanten in Koexpression mit M-und E-Proteinen an die Zelloberfläche zu wandern. Zusätzlich zu den Cys-Mutanten wurden TGEV S-Chimären untersucht. Diese Chimären sollten Aufschluss darüber geben, ob der zytoplasmatische Abschnitt des S-Proteins ausreichend ist, um den Einbau des S-Proteins in Viruspartikel zu vermitteln, bzw. welche Rolle der C-terminale Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne spielt. Die beiden Chimären in denen entweder die letzten 16 Aminosäuren (GGS16) oder die letzten 40 Aminosäuren (GGS40) des C-terminalen zytoplasmatischen Abschnitts an die Transmembran- und Ektodomäne des VSV G-Proteins fusioniert wurden, zeigten beide keine Zelloberflächenexpression in Koexpression mit dem TGEV E- und M-Protein.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass eine volle TGEV Cys-Mutante nicht in VLPs eingebaut wird, partielle Cys-Mutanten hingegen schon. Wobei die Position der vorhandenen Cysteinreste in dem CRM keine Bedeutung hat. Die Transmembrandomäne in Kombination mit dem cysteinreichen Motiv sind notwendig für einen Einbau.

Eine mögliche Erklärung für den Einbau der partiellen Cys-Mutanten in VLPs ist, dass diese palmitoyliert werden (s. Kapitel 4.1.3), im Gegensatz zu der vollen Cys-Mutante, die palmitoylierungsdefizient ist. Ob das Palmitoylierungsmuster innerhalb von TGE-Viruspartikeln ebenso aussieht, kann durch die Mutanten nicht geklärt werden. Es ist möglich, dass durch das Entfernen einer potentiellen Acylie-

rungsstelle ein anderes Cystein palmitoyliert wird, das normalerweise im Viruskontext nicht acyliert wird. Bei der Betrachtung der Ergebnisse, sollte dies berücksichtigt werden. Um eine genauere Auskunft über das Palmitoylierungsmuster des S-Proteins im Viruskontext zu bekommen, könnte eine Massenspektrometrische Untersuchung des TGEV S-Proteins erfolgen (Die massenspektrometrische Untersuchung von TGE-Viruspartikeln ist mit einer Kooperationsgruppe in Bearbeitung). Drei Cysteinreste in dem CRM des TGEV S-Proteins sind unabhängig von ihrer Position ausreichend für den Einbau des S-Proteins in VLPs. Dies steht im Gegensatz zu den SARS-CoV-Studien (Ujike et al., 2012). Dort wurde gezeigt, dass ebenfalls partielle SARS-CoV S-Cys-Mutanten palmitoyliert werden, jedoch war der Einbau abhängig vom Vorhandensein der letzten beiden C-terminalen Cysteinreste. Für MHV konnte gezeigt werden, dass alleinig die Endodomäne des MHV S-Proteins verantwortlich ist für den Einbau in VLPs (Bosch et al., 2005) bzw. in rekombinante Viren (Ye et al., 2004; Yang et al., 2012). Für TGEV scheint auch die Transmembrandomäne für die Bildung von VLPs wichtig zu sein. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Chimären nicht auf Palmitoylierung untersucht wurden. Trotz des authentischen CRM in dem chimären Protein GGS40 spielt die benachbarte Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne ebenfalls eine Rolle bei der potentiellen Palmitoylierung (Weber, 2006). So kann es hier durch die TMD des VSV G-Proteins zu einer Verhinderung der Palmitoylierung gekommen sein und deswegen zu der nicht vorhanden Proteininteraktion. In weiteren Experimenten, wäre es daher sinnvoll den Palmitoylierungstatus dieser Mutante zu untersuchen.

TGEV S-Proteine werden im ER zu Trimeren zusammengebaut und während des Viruszusammenbaus im ERGIC in die Viruspartikel integriert (Opstelten et al., 1993; Delmas und Laude, 1990; Tooze et al., 1984). Palmitoylierung spielt bei vielen Proteinen eine Rolle in der Ausbildung bzw. Stabilisierung von oligomeren Proteinkomplexen (Kobe et al., 2008; Feig et al., 2007; Olsen et al., 1984). Die Ergebnisse der Saccharose-Gradienten (siehe Kapitel 4.4) zeigen, dass die palmitoylierungsdefiziente Cysteinmutante wie das S-Wildtypprotein in der Lage ist oligomere Formen auszubilden. Der fehlende Einbau dieser Mutante in VLPs ist somit vermutlich nicht auf eine mangelhafte Oligomerisierung zurückzuführen. Es lässt

sich jedoch nicht vollständig ausschließen, dass die palmitoylierungsdefiziente Cystein-Mutante weniger stabile Oligomere ausbildet.

Die Untersuchung von VLPs bietet eine gute Möglichkeit die Interaktionen der viralen Strukturproteine während des Zusammenbaus der viralen Hülle zu untersuchen. Trotzdem ist, zur Aufklärung der authentischen Funktion von viralen Proteinen die Untersuchung im Viruskontext notwendig. Denn nur so können andere virale Replikationsschritte wie Rezeptorbindung und Fusion und damit zusätzliche zelluläre Interaktionspartner berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des Viruseintritts mit rekombinanten Viren gearbeitet. Das Genom von Coronaviren hat eine Länge von ca. 30 kb und ist somit das größte unter den bekannten RNA-Viren. Im Jahr 2000 ist es Almazan et al. gelungen ein cDNA-basiertes reverses Genetik-System für TGEV zu entwickeln (Almazan et al., 2000). Dazu wurde eine cDNA, codierend für das infektiöse TGEV RNA-Genom (Abb. 3-17), in ein *Bacterial artificial chromosome* (BAC) kloniert. BACs sind *low-copy*-Plasmide, die es erlauben stabil, große DNA-Sequenzen in Bakterienzellen zu klonieren. In dieser Arbeit wurde ein Komplementierungs-Assay verwendet. Die rTGEV-S_YI/AA-Mutante ist nicht fähig, Zellen zu infizieren, die den TGEV-Rezeptor (pAPN) tragen. Wird dieser Mutante jedoch *in trans* das S-Wildtypprotein zur Verfügung gestellt, findet eine Komplementierung statt und es enstehen infektiöse Viruspartikel. In dieser Arbeit wurde die palmitoylierungsdefiziente TGEV S-Mutante S_C$_{1-10}$A *in trans* zur Verfügung gestellt, um zu untersuchen, ob sie im Viruskontext in die Partikel eingebaut wird und infektiöse Viruspartikel formen kann.

Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl das rTGEV-Swt als auch das rTGEV-S_YI/AA in Komplementierung mit S-Wildtypprotein, in der Lage waren infektiöse Partikel zu bilden. Bei der Komplementierung mit der Cys-Mutante S_C$_{1-10}$A konnte jedoch keine Infektion der Zellen gezeigt werden. Dieses Ergebnis, war aufgrund der VLP-Versuche zu erwarten gewesen, da die volle Cys-Mutante auch dort nicht eingebaut wurde. In weiteren Experimenten wäre es sinnvoll die partiellen Cys-Mutanten, die in VLPs eingebaut werden, in dem Komplementierungs-Assay zu untersuchen. Denn ein weiterer Vorteil dieses Tests ist die Möglichkeit die Fusionskompetenz von unterschiedlichen TGEV S-Mutanten testen zu können.

Coronavirale S-Proteine sind beim Eintritt in die Wirtszelle für die Fusion der viralen und zellulären Membran verantwortlich (Bosch et al., 2003; Gallagher et al., 1991; Luo et al., 1998; Madu et al., 2009). Dabei wird dem CRM im zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins eine wichtige Funktion zugeordnet (Bos et al., 1995; Chang et al., 2000; Petit et al., 2007). Die cysteinreiche Region in Kombination mit der Transmembrandomäne der coronaviralen S-Proteine spielt ebenfalls bei der Fusion von Zell-und Zellmembran (Syncytienbildung) eine wichtige Rolle (Bos et al., 1995; Chang et al., 2000; Petit et al., 2007, McBride et al., 2010; Bosch et al., 2005; Shulla und Gallagher, 2009). Bei der Fusion kommt es zu einer Konformationsänderung des S-Proteins und zur Bildung des so genannten sechs-Helix-*Bundle*, das durch die Interaktion der HR1 und HR2-Helices entsteht und die virale und zelluläre Membran in räumliche Nähe zu einander bringt (Bosch et al., 2003). Bei MHV konnte gezeigt werden, dass rekombinante Viren mit Cystein-Substitutionen im S-Protein Zellen langsamer infizieren und eine reduzierte Infektiösität zeigten (Shulla und Gallagher, 2009). Der Grund hierfür war die verlangsamte Faltung des S-Proteins und eine reduzierte Ausbildung des sechs-Helix-*Bundle* (Shulla und Gallagher, 2009). Mit Hilfe des Komplementierungs-Assays können zukünftig Experimente durchgeführt werden, um die Bedeutung des CRM des TGEV S-Proteins beim Viruseintritt näher zu untersuchen.

5.1.2 Bedeutung der Palmitoylierung des TGEV S-Proteins bei der Interaktion mit dem M-Protein

Für den Einbau des S-Proteins in Viruspartikel spielt die Interaktion mit dem M-Protein eine wichtige Rolle. Die Bedingungen für die S-M-Proteininteraktion sind bei SARS-CoV und MHV jedoch unterschiedlich. Für das MHV S-Protein konnte gezeigt werden, dass es durch eine Behandlung mit 2-BP zu einer Aufhebung der S-M-Proteininteraktion kommt (Thorp et al., 2006). Ebenfalls konnte durch die Mutagenese der letzten drei C-terminalen Cysteinreste im CRM des MHV S-Proteins zu einer Aufhebung der S-M-Proteinteraktion in einer Koimmunpräzipitation gemessen werden (Shulla und Gallagher, 2009). Für das SARS-CoV S-Protein sind jedoch die Bedingungen für die S-M-Proteininteraktion anders postuliert. Eine SARS-CoV S-Proteinmutante, bei der alle Cysteinreste ausgetauscht sind und die

palmitoylierungs-defizient ist, kann noch mit dem SARS-CoV M-Protein interagieren (McBride und Machamer, 2010; Ujike et al., 2012). In dieser Doktorarbeit wurde untersucht, ob auch die S-M-Proteininteraktion vonTGEV durch die Palmitoylierung beeinflusst wird.

Dazu wurden u.a. Cys-Mutanten eingeführt, die ein zerstörtes Retentionssignal durch die Mutation Y/A hatten. Die Y/A-Mutante ist in der Lage mit dem M-Protein zu interagieren (siehe Kapitel 5.2). Das Einführen dieser Y/A-Mutation, war nötig, um eine Expression der verschiedenen Cystein-Mutanten bzw. Chimären an der Plasmamembran zu erzielen und so eine mögliche Interaktion mit dem M-Protein beobachten zu können. Denn durch eine Interaktion werden die Y/A-Mutanten intrazellulär zurückgehalten und zeigen ein verändertes intrazelluläres Expressionsmuster.

Die Palmitoylierung ist bei einigen Proteinen verantwortlich für den Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Thorne et al., 2010). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen zeigten jedoch, dass die volle Cysteinmutante und die partiellen Cys-Mutanten mit Y/A-Mutation, genau wie die Y/A-Mutante eine Zelloberflächenexpression zeigten. Auch die Cys-Mutanten mit intaktem Retentionssignal zeigten eine vergleichbare intrazelluläre Lokalisation und Retention, wie das S-Wildtypprotein. Für das CoV E-Protein ist ebenfalls beschrieben, dass die Palmitoylierung keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation am Golgi-Apparat hat (Boscarino et al., 2008; Corse et al., 2002; Lopez et al., 2008).

Die Ergebnisse zeigten (siehe Kapitel 4.3.2), dass alle partiellen Cys-Mutanten und auch die palmitoylierungsdefiziente Cys-Mutante eine intrazelluläre Retention und eine veränderte intrazelluläre Verteilung in Koexpression mit dem MHA-Protein zeigten. Auch die Ergebnisse der Untersuchungen zum Glykosylierungsmuster zeigten, dass alle Cys-Mutanten in Koexpression mit dem authentischen M-Protein einen Banden-*Shift* aufwiesen, was ebenfalls für eine Interaktion mit dem M-Protein sprach (siehe Kapitel 4.3.4). Die Deletionsmutanten, bei denen unterschiedliche C-terminale Sequenzen (26 oder 35 AS) des zytoplasmatischen Abschnitts deletiert waren und nur noch Teile des CRM vorhanden waren, konnten ebenfalls durch das MHA-Protein intrazellulär zurückgehalten werden. Die Chimä-

ren hingegen zeigten keine intrazelluläre Lokalisation und kein verändertes intrazelluläres Verteilungsmuster. Die Ergebnisse zeigen, dass die Transmembrandomäne des TGEV S-Proteins eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit dem TGEV M-Protein hat.

Die Bedingungen für die S-M-Proteininteraktion scheinen bei den Coronavirusspezies unterschiedlich zu sein. Ist die Palmitoylierung des S-Proteins inhibiert kommt es bei TGEV und SARS-CoV (McBride und Machamer, 2010) noch zu einer S-M-Proteininteraktion, bei MHV (Thorp et al., 2006) hingegen nicht. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass die S-M-Proteininteraktion unterschiedlich nachgewiesen wurden. Für MHV konnte die Interaktion per Koimmunpräzipitation gezeigt werden. Für SARS-CoV beruhen die Angaben zur S-M-Proteininteraktion hingegen auf Immunfluoreszenzanalysen (IFA) von S- und M-Protein koexprimierenden Zellen. Bei einer Koimmunpräzipitation können nicht so stabile Proteinkomplexe zerstört werden. Es wäre denkbar, dass bei der Koimmunpräzipitation der nicht acylierten MHV S-Proteine mit dem M-Protein die Proteininteraktion aufgrund des Fehlens der Fettsäuren nicht so stabil ist und sie sich daher eher bei der IP trennen. Es könnte sein, dass das nichtacylierte MHV S-Protein trotzdem noch Interaktionen, wie das TGEV S- und das SARS-CoV S-Protein mit dem M-Protein ausbildet. Auch in dieser Arbeit wurde die Interaktion der beiden Proteine mit Immunfluoreszenz untersucht. Es wurde versucht neben der IFA eine Koimmunpräzipitation zu etablieren. Jedoch waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar und lieferten keine Erkenntnisse, über eine Interaktion der TGEV Cys-Mutanten mit dem M-Protein. Die Koimmunpräzipitations-Protokolle, wie sie für MHV veröffentlicht sind, können nicht auf TGEV übertragen werden. Auch für SARS-CoV liegen keine veröffentlichen Daten zu einer Koimmunpräzipitation der S- und M-Protein vor. Ein *Cross-Linking* der Proteine, um die Proteininteraktion zu stabilisieren, wurde bereits in vorherigen Arbeiten mit DSS und DTSSP, ebenfalls erfolglos, durchgeführt (Sötkamp, 2009). Um eine direkte Proteininteraktion der beiden TGEV Proteine nachzuweisen, wäre eine FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*)-Analyse eine mögliche weitere Option (Pan et al., 2010; Yu et al., 2013; Hoppe et al., 2013).

5.1.3 Mögliche Erklärungen zum Einbau des S-Proteins in Viruspartikel

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Palmitoylierung des S-Proteins für eine Interaktion mit dem M-Protein nicht notwendig ist, jedoch für den Einbau in VLPs. Warum sich diese Bedingungen voneinander unterscheiden, und welche Bedeutung die Palmitoylierung während des Viruszusammenbaus haben kann, soll mit Hilfe der folgenden Erklärungen diskutiert werden.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass für die S-M-Proteinwechselwirkung die Interaktion der Transmembrandomäne des S-Proteins ausreichend ist (Abb. 5-1, Bild A), während der Knospung jedoch die Interaktion der beiden zytoplasmatischen Domänen des S- und M-Proteins notwendig sind, um einen erfolgreichen Einbau des S-Proteins in Viruspartikel zu erzielen. Ist das S-Protein nicht palmitoyliert, ist die zytoplasmatische Domäne nicht durch die Palmitinsäuren mit der Membran assoziiert und nimmt eine Konformation ein, die keine ausreichende Interaktion mit dem M-Protein ausbildet und das S-Protein verbleibt während der Knospung in der ERGIC-Membran (Abb. 5-1, B). Ist das S-Protein hingegen palmitoyliert, so nimmt die zytoplasmatische Domäne eine bestimmte Struktur ein, die eine ausreichende Interaktion mit dem M-Protein ausbildet und dadurch für den Einbau des S-Proteins in neue Viruspartikel sorgt (Abb. 5-1, C). Ein Tyrosinrest in dem SARS-CoV M-Protein konnte für die Interaktion mit dem SARS-CoV S-Protein identifiziert werden (McBride und Machamer, 2010b). Auch in dem TGEV M-Protein existiert am zytoplasmatischen Abschnitt ein Tyrosinrest, der die Interaktion mit dem S-Protein vermitteln könnte. Palmitinsäuren assoziieren mit der Phosholipidmembran und verankern die zytoplasmatischen Abschnitte der Proteine mit ihr. Vermutlich entsteht dadurch eine bestimmte Konformation der zytoplasmatischen Domänen der trimeren S-Proteine, die für die Interaktion mit dem Tyrosin notwendig ist. Es ist beschrieben, dass der zytoplasmatische Abschnitt des MHV S-Proteins eine amphipatische α-Helix ausbildet, die ebenfalls für die Interaktion mit dem M-Protein und für den entsprechenden Einbau des S-Proteins in Partikel verantwortlich sein kann (Bosch et al., 2005). Bei dieser Struktur wird angenommen, dass die Cysteinreste auf der einen Seite der Helix vorliegen und angeknüpfte Palmitinsäuren die Helix in der Lipidmembran verankern und damit

stabilisieren. Dadurch wird eine stabilere S-M-Proteininteraktion ausgebildet, und das S-Protein kann bei der Knospung in neue Viruspartikel eingebaut werden.

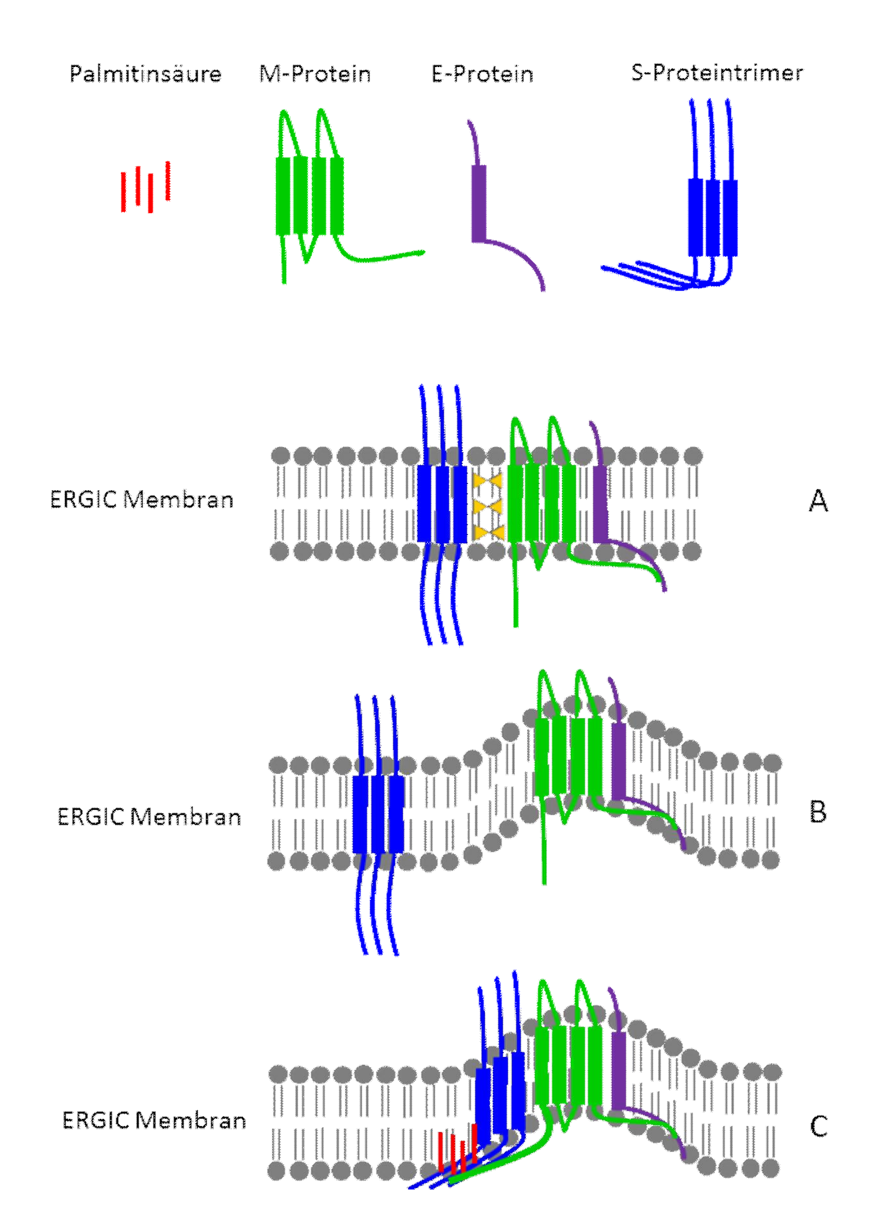


Abb. 5-1 Palmitolyierung ermöglicht die Interaktionen der beiden zytoplasmatischen Domänen des S- und M-Proteins.
Das S-Protein ist als Trimer dargestellt (blau). Die M- (grün) und E- (lila) Proteine sind aus Übersichtsgründen nicht in ihren homomeren Formen innerhalb der ERGIC-Membran dargestellt. Die angeknüpften Palmitinsäuren sind in rot dargestellt. **A:** Das palmitoylierungsdefiziente S-Protein interagiert mit dem M-Protein über die Transmembrandomänen. **B:** Bei der Knospung kann die Interaktion mit dem palmitoylierungsdefizienten S-Proteintrimer nicht mehr mit dem M-Protein aufrecht erhalten werden und das S-Proteintrimer verbleibt in der ERGIC-Membran. **C:** Die Palmitoylierung des S-Proteins sorgt für eine ausreichende Interaktion mit dem M-Protein und es wird mit in die knospenden Viruspartikel eingebaut.

Palmitoylierung kann bei Membranproteinen (Kandasamy und Larson, 2006; Lam et al., 2006; Greaves und Chamberlain, 2007) das Neigen der Transmembrando-

mänen (TMD) herbeiführen und zu einer Konformationsänderung der Proteine führen (Joseph und Nagaray, 1995). Eine weitere Erklärung könnte somit sein, dass diese Konformationsänderung der TMD des S-Proteins wichtig ist für die Interaktion mit dem M-Protein und zum Einbau des S-Proteins in Viruspartikel führt. Für die Konformationsänderung der TMD sind nicht alle Palmitate verantwortlich, sondern einige wenige genügen, um die Neigung der TMD zu erzielen (Abb. 5-2). Hochauflösende Elektronenmikroskop Aufnahmen von SARS-CoV Partikeln zeigen, dass das S-Protein in die multimeren M-Proteinstrukturen innerhalb von Viruspartikeln eingebettet ist (Neumann et al., 2006). Unter Umständen wird durch die Palmitoylierung eine geordnete Struktur der zytoplasmatischen Domänen der S-Proteintrimeren erreicht, die essentiell ist für die Einlagerung in diese M-Proteinkomplexe, die sich während des Viruszusammenbaus an der ERGIC-Membran bilden, und das S-Protein wird dadurch in die Viruspartikel eingebaut.

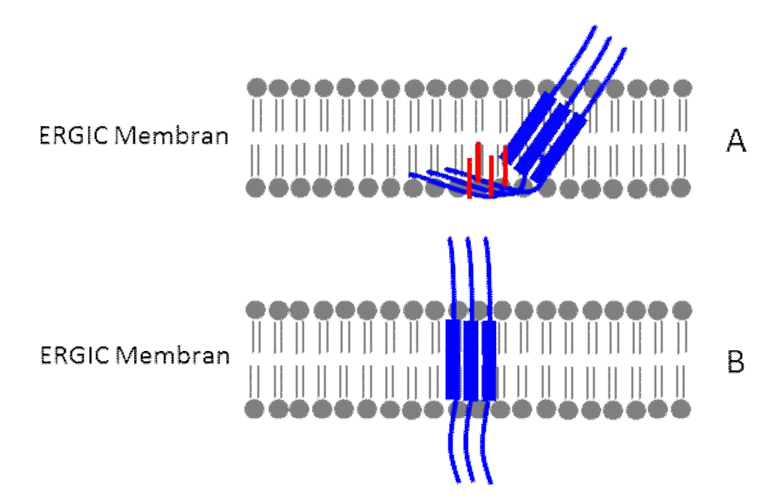


Abb. 5-2 Palmitoylierung bestimmt die Konformation des S-Proteins.
A: Angelagerte Fettsäuren (rot) an das S-Protein (blau) lagern sich in die ERGIC-Membran ein und führen zu einer Neigung der Transmembrandomäne des S-Proteins. **B:** Das S-Protein ist nicht palmitoyliert und hat eine zur ERGIC-Membran senkrecht verlaufende Transmembrandomäne.

Es konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung in Wechselwirkung mit anderen post-translationalen Modifikationen, wie z.B. Ubiquitinylierung, treten kann (Valdez-Taubas und Pelham, 2005; Abrami et al., 2008, 2006; Percherancier et al., 2001). Dabei verdecken die angelagerten Fettsäuren die potentielle Modifikationsstelle innerhalb des Proteins. Im cysteinreichen Motiv des TGEV S-Proteins liegt ein Threoninrest vor, der bei allen anderen coronaviralen S-Proteinen konserviert ist. Außerdem kommen noch vier Serinreste vor, die, wie auch Threonin, potentielle Phosphorylierungsstellen darbieten (Abb. 5-3, B). Eine Phosphorylierung

von Proteinen kann die Interaktion mit anderen Proteinen inhibieren. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die gebundenen Fettsäuren der S-Proteine einer Phosphorylierung entgegen treten und somit den zytoplasmatischen Abschnitt des S-Proteins mit dem M-Protein interagieren lassen (Abb. 5-3, A) und dadurch die ausreichende Interaktion der beiden Proteine während des Viruszusammenbaus gewährleisten.

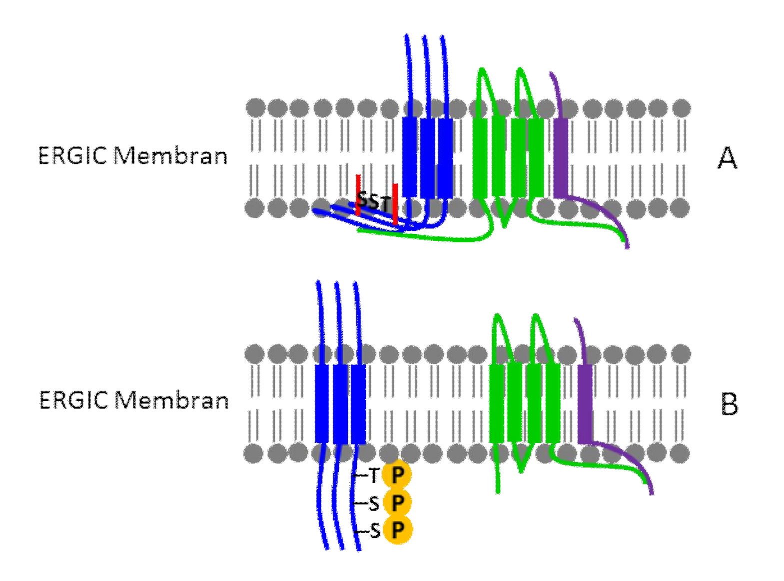


Abb. 5-3 Wechselwirkung der Palmitoylierung mit anderen post-translationalen Modifikationen.
A: Potentielle Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne des S-Proteins werden durch Palmitinsäuren verdeckt. **B:** Die potentiellen Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domäne des S-Proteins sind nicht durch Fettsäuren verdeckt und können phosphoryliert (gelbe Kreise) werden. Die Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des M-Proteins kann nicht mehr erfolgen.

Die Palmitoylierung von Proteinen kann bewirken, dass sich diese mit interagierenden Proteinen an gleichen Membrandomänen sammeln (Heakel et al., 2011). Eine Palmitoylierung kann die Assoziation mit cholesterol- und sphingolipidreichen Membrandomänen, den so genannten *lipid rafts* an der Plasmamembran bestimmen (Levental et al., 2010; Charollais und van der Goot, 2009). Auch an intrazellulären Membranen spielt die Palmitoylierung von Proteinen eine wichtige Rolle beim Rekrutieren von Proteinen in bestimmten Membrandomänen. Das Chaperon Calnexin und das transmembrane Thioredoxin-Protein (TMX) werden durch Palmitoylierung an bestimmten detergenz-resistenten Membrandomänen (Hayashi und Fujimoto, 2010) des Endoplasmatischen Retikulum rekrutiert (Lynes et al., 2012). Auch das coronavirale E-Protein, dass wichtige Funktionen während der

Knospung hat, wird palmitoyliert (Boscarino et al., 2008; Lopez et al., 2008; Corse und Machamer, 2002). Durch das Vorhandensein von Palmitinsäuren ist es denkbar, dass die E- und S-Proteine an gleichen Membrandomänen des ERGIC eingelagert werden (Abb. 5-4, A). Wenn dem S-Protein die Palmitinsäuren fehlen, kommt es möglicherweise zu einer Einlagerung in andere Membrandomänen, in denen sich zwar auch M-Protein befindet, welches aber nicht mit E-Protein assoziiert ist. Das S-Protein gelangt so nicht in die Membrandomänen, in denen sich das E-Protein gemeinsam mit dem M-Protein befindet, um die Knospung der CoV-Partikel einzuleiten und das S-Protein wird nicht in Viruspartikel eingebaut (Abb. 5-4, B).

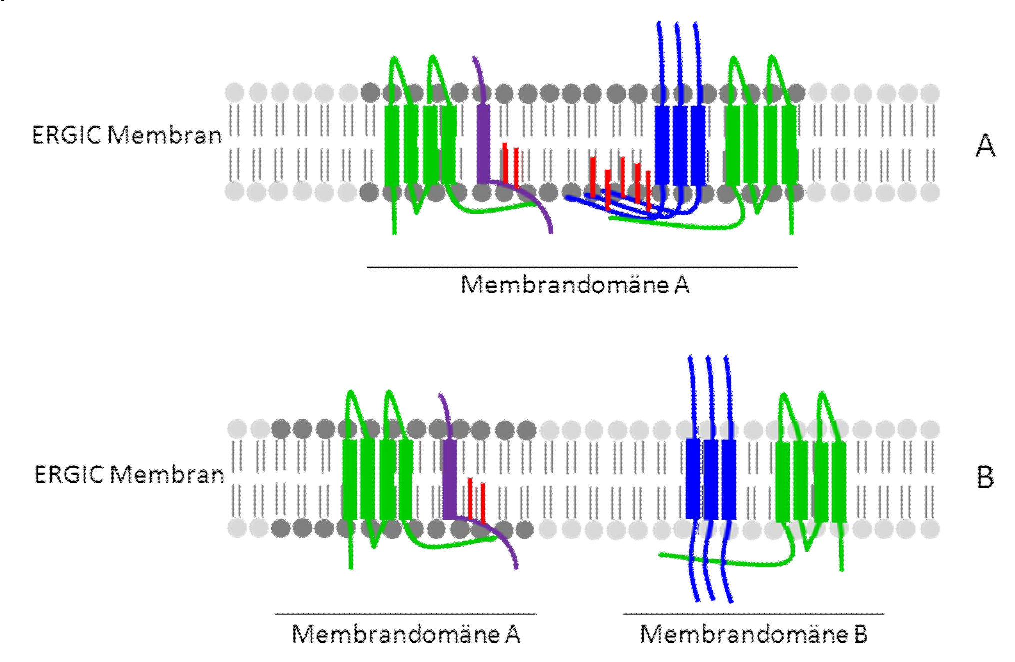


Abb. 5-4 Palmitoylierung bestimmt die Einlagerung in bestimmte Domänen der ERGIC-Membran.
A: Das S-Protein ist palmitoyliert und wird, wie das palmitoylierte E-Protein, das Interaktionen mit dem M-Protein eingeht, in einer Membrandomäne des ERGIC rekrutiert. **B:** Das palmitoylierungsdefiziente S-Protein wird nicht mit E- und M-Proteinkomplexen in einer Membrandomäne lokalisiert, an der die Knospung stattfindet.

Proteine werden im sekretorischen Transportweg im ERGIC gesammelt und sortiert (Appenzeller-Herzog und Hauri, 2006). Eine weitere Erklärung wäre, dass ERGIC-Proteine für eine Sortierung der viralen Proteine im ERGIC sorgen, die wichtig ist für die Knospung der Coronaviren. Eine aktuelle Studie konnte die Interaktion des Transport-Rezeptors ERGIC-53 (Appenzeller et al., 1999) mit verschiedenen viralen Fusionsproteinen, darunter auch das SARS-CoV S-Protein, nachweisen (Klaus et al., 2013). Die Bildung von infektiösen VSV-

Pseudopartikeln, die SARS-CoV S-Protein enthielten, wurde in Zellen, die ein mutiertes ERGIC-53 exprimierten, signifikant reduziert (Klaus et al., 2013). Vielleicht ist die Interaktion der palmitoylierungsdefizienten S-Proteinmutante mit ERGIC-53 oder einem anderen zellulären Protein-X im ERGIC gestört und es kommt daher zu keiner entsprechenden Membransortierung des S-Proteins im ERGIC (Abb. 5-5, Bild B), die für den Einbau in die knospenden Viruspartikel notwendig wäre (Abb. 5-5, Bild A).

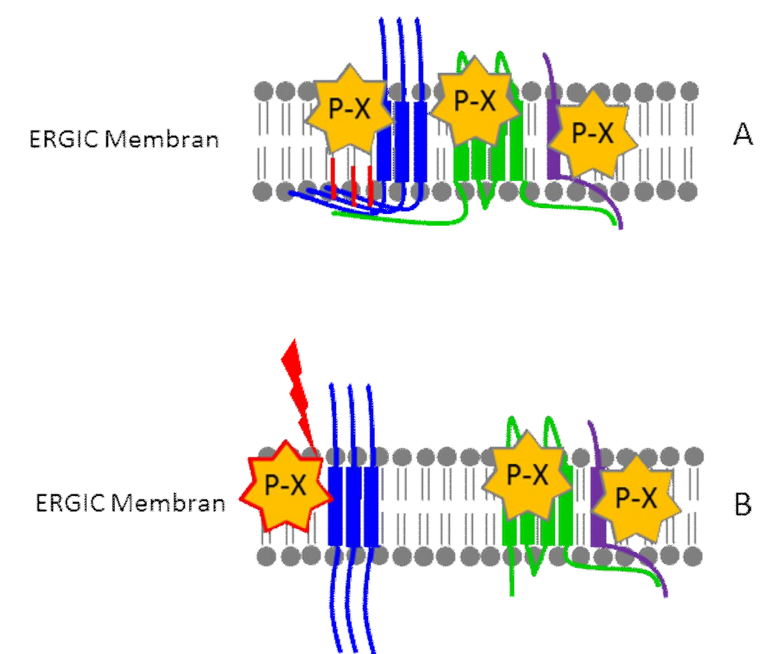


Abb. 5-5 Interaktionen mit zellulären Proteinen im ERGIC.
A: Das palmitoylierte S-Protein ist fähig mit dem zellulären ERGIC-Protein-X (P-X) zu interagieren. P-X sorgt für eine Sortieurung der viralen Proteine innerhalb des ERGIC. **B:** Nicht-palmitoyliertes S-Protein kann nicht mehr mit dem Protein-X interagieren und wird an unterschiedlichen Membranbereichen lokalisiert und wird nicht in Viruspartikel eingebaut.

5.2 Bedeutung des Tyrosin-basierten Retentionssignals für die Interaktion mit dem M-Protein

Tyrosin-basierte Signale sind bei vielen Proteinen vorhanden und bestimmen ihre intrazelluläre Sortierung. Diese Signale sind verantwortlich für die Sortierung von lysosomalen Endosomen, die basolaterale Sortierung, Lokalisation im trans-Golgi-Netzwerk oder für die Endozytose und intrazelluläre Retention von zellulären und viralen Proteinen (Rohrer et al., 1996; Thomas und Roth, 1994; Letourneur und Klausner, 1992; Mallabiabarrena et al., 1992; Howe et al., 1988).

Die Konsensus-Sequenz eines Tyrosin-Signals ist Yxxθ, wobei x für eine beliebige Aminosäure und θ für eine hydrophobe Aminosäure steht. Das TGEV S-Protein besitzt ebenfalls ein solches Signal. Das Motiv entspricht der YXXθ-Konsensus-Sequenz, 1440YEPI1443, und befindet sich im Carboxy-terminalen zytoplasmatischen Abschnitt des Proteins. Dieses Signal fungiert im TGEV S-Protein als ein Retentionssignal, und führt zu der Lokalisierung des Proteins am ERGIC, dem Ort des Viruszusammenbaus (Paul et al., 2014; Schwegmann-Wessels et al., 2004). In dem IBV S-Protein befindet sich ebenfalls ein Tyrosin-basiertes Retentionssignal (Winter et al., 2008). Das SARS-CoV S-Protein z.B. enthält hingegen kein Tyrosin-basiertes Retentionssignal, wird nicht intrazellulär zurückgehalten und zeigt somit eine Zelloberflächenexpression (Schwegmann-Wessels et al., 2004). Tyrosin-Signale interagieren mit zellulären Proteinen und beeinflussen damit die intrazellulläre Sortierung der entsprechenden Proteine (Bonifacino und Dell’Angelica, 1999). Es wird angenommen, dass das Tyrosin-basierte Signal des TGEV S-Proteins mit einem noch unbekannten zellulären Protein interagiert und damit die die Retention am ERGIC bestimmt (Schwegmann-Wessels et al., 2004).

Der Kontext der Aminosäuresequenz in der Umgebung dieses Signals spielt eine wichtige Rolle in der Funktion der entsprechenden Tyrosin-Signale (Bonifacino und Dell’Angelica, 1999). Im Glykoprotein G des VSV kommt ebenfalls ein Tyrosin-basiertes Signal vor, dass zusammen mit einem sauren DXE-Motiv und einem Methioninrest den ER-Export bestimmt und zur basolateralen Verteilung des Proteins führt (Sevier et al., 2000; Nishimura et al., 1999; Nishimura und Balch, 1997). Mutagenesestudien sollten den Aminosäurekontext in der Umgebung des Tyrosin-Signals innerhalb des TGEV S-Proteins charakterisieren und zeigten, dass die Mutation eines stromabwärts gelegenen Lysins in ein Methionin das Retentionssignal in ein Endozytosesignal umwandelt (Paul et al., 2014). Diese sogenannte TGEV S-K/M-Mutante wird an der Zelloberfläche exprimiert und anschließend endozytiert.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Tyrosin-Signal auf die Interaktion mit dem M-Protein hat. Dazu wurde eine Mutante, in der das Tyrosin-Signal durch die Substitution des Tyrosins durch ein Alanin (Y/A-Mutante) zerstört wurde, und die oben beschriebene K/M-Mutante in Immunfluoreszenzanaly-

sen untersucht (siehe Kapitel 4.3.1). Es zeigte sich, dass sowohl die Y/A- als auch die K/M-Mutation innerhalb des TGEV S-Proteins keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem M-Protein hatten. Beide Proteinmutanten wurden in Koexpression mit dem M-Protein intrazellulär zurückgehalten und kolokalisierten mit dem M-Protein in einer perinukleären Region.

Sowohl die Y/A- als auch die K/M-Mutante verlieren in Einzelexpression beide ihre intrazelluläre Retention, was durch die fehlende Interaktion mit dem bisher unbekannten zellulären Interaktionspartner erklärt werden kann. Die Mutationen führen sehr wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung in diesem Bereich des S-Proteins und vermitteln nicht mehr die Bindung an das zelluläre Protein. Strukturanalysen des Tyrosin-Motivs eines epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) mit der µ2-Untereinheit des Adaptorproteins 2 (AP2) zeigen, dass sich durch den Tyrosinrest hydrophobe Taschen innerhalb des EGFRs bilden, die die Interaktion mit der µ2-Untereinheit vermitteln (Owen und Evans, 1998). Adaptorproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose (Schmid, 1997; Wigge und McMahon, 1998). Das Tyrosin bildet dabei mehrere Interaktionen mit den benachbarten Aminosäurresten aus. Der aromatische Ring des Tyrosins vermittelt hydrophobe Interaktionen mit Tryptophan, Phenylalanin und Arginin. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins ist in Wasserstoffbrücken mit Asparaginsäure, Lysin und Arginin involviert (Owen und Evans, 1998). Wird das Arginin in dieser hydrophoben Tasche durch ein Phenylalanin ersetzt, ist nur noch eine schwache Bindung mit der µ2-Untereinheit des AP2 festzustellen (Ohno et al., 1996). Die Bildung einer solchen hydrophoben Tasche ist auch bei dem Retentionssignal des TGEV S-Proteins denkbar. Bei der Y/A- und K/M-Mutante werden Konformationsänderungen dieser hydrophoben Tasche erzeugt, die eine Interaktion mit dem zellulären Protein nicht mehr zu lassen.

Obwohl offensichtlich die intrazelluläre Retention dieser beiden Proteinmutanten durch die ausbleibende Interaktion mit dem zellulären Protein aufgehoben ist, findet trotzdem eine Interaktion mit dem M-Protein statt. Für die Interaktion mit dem M-Protein sind somit andere Sequenzabschnitte innerhalb des S-Proteins verantwortlich (s.a. Kapitel 5.1.2). Die Lokalisation der viralen Proteine am Ort des Viruszusammenbaus ist für Viren essentiell, um vollständige und infektiöse Viren

innerhalb der Wirtszellen zu bilden. Womöglich haben Coronaviren mehrere Mechanismen entwickelt, diese intrazelluläre Lokalisation zu erfüllen. Neben der intrazellulären Retention durch intramolekulare Signalpeptide ist womöglich auch die Interaktion mit dem M-Protein eine Option die Lokalisierung an einem intrazellulären Ort sicherzustellen. Ob hier die Interaktion mit dem M-Protein ausreicht, um einen Einbau in Viruspartikel zu erhalten, kann mit Hilfe eines VLP-Assays und rekombinanten Viren untersucht werden.

5.3 Ausblick

Der Replikationszyklus von Coronaviren ist vielfältig und noch lange nicht vollständig entschlüsselt. Die Interaktionen von viralen und zellulären Proteinen spielen eine große Rolle bei der Bildung von neuen Viruspartikeln. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des zytoplasmatischen Abschnitts des TGEV S-Proteins beim Viruszusammenbau untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Palmitoylierung des S-Proteins eine wichtige Bedeutung bei dem Einbau des S-Proteins in neue Viruspartikel hat. Der Einbau des S-Proteins ist ein bedeutsamer Schritt im Replikationszyklus von Coronaviren. Denn alleinig durch das Vorhandensein des S-Proteins in Viruspartikeln wird den Coronaviren Infektiösität verliehen. Die Infektiösität von Viren ist eine unabdingbare Eigenschaft, um sich in Wirtsorganismen zu vermehren.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten genutzt werden, um den Einbau des S-Proteins während einer Infektion zu blockieren und somit die Ausbreitung des Virus in infizierten Zellen zu verhindern. Die Enzymologie der Palmitoylierung ist komplex und die Enzyme, die eine Palmitoylierung katalysieren, sind nicht spezifisch für bestimmte Proteine. Eine Inhibierung der Palmitoylierung in einer infizierten Zelle bzw. einem Organismus würde die Acylierung des coronaviralen S-Proteins nicht zielgerichtet angreifen können. Durch eine unspezifische Blockierung der Palmitoylierung würden zu viele zelluläre Proteine in ihrer natürlichen Funktion gestört werden. Es könnten jedoch Peptide synthetisiert werden, die an das cysteinreiche Motiv binden und damit die Palmitoylierung des S-Proteins verhindern. Das würde dazu führen, dass das S-Protein nicht in Viruspartikel inkorpo-

riert wird. Oder die Peptide würden eine erfolgreiche Interaktion mit dem M-Protein verhindern und dadurch würde das S-Protein nicht in neue Viruspartikel eingebaut werden. Die Wirkung solcher Peptide ist u.a. für die Blockierung des Capsidzusammenbaus des humanen Immundefizienz Virus (HIV) beschrieben. Das zellpenetrierende Peptid (CAI, *capsid assembly inhibitor*) bindet dabei an die Capsid (CA)-Domäne des Gag-Proteins und inhibiert den Zusammenbau von HIV-Capsid-Partikeln *in vitro* (Sticht et al., 2005; Zhang et al., 2013).

Die Erkenntnisse von TGEV könnten für die Entwicklung von Therapeutika herangezogen und auf andere Coronaviren übertragen werden.

Literaturverzeichnis

Abrami L., Kunz B., Iacovache I., van der Goot F.G. (2008) **Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum** PNAS, 105 (14): 5384–5389

Abrami L., Leppla S.H., van der Goot F.G. (2006) **Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis** The Journal of Cell Biology, 172 (2): 2006 309–320

Almazán F., González J.M., Pénzes Z., Izeta A., Calvo E., Plana-Durán J., Enjuanes L. (2000) **Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome** PNAS, 97 (10): 5516–5521

Almeida J.D., Berry D.M., Cunningham C.H., Hamre D., Hofstadt M.S., Mallucci L., McIntosh K. (1968) **Virology – Coronaviruses** Nature, 220: 650

Almeida J.D. und Tyrrell D.A.J. (1967) **The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture** J. gen. Virol., 1: 175-178

Appenzeller-Herzog C., Hauri H.P. (2006) **The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function** Journal of Cell Science 119, 2173-2183

Appenzeller C., Andersson H., Kappeler F., Hauri H.P. (1999) **The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins** Nature Cell Biology, 1: 330-334

Arkin I.T. und Brunger A.T. (1998) **Statistical analysis of predicted transmembrane K-helices** Biochimica et Biophysica Acta 1429: 113-128

Arndt A.L., Larson B.J.,Hogue B.G. (2010) **A Conserved Domain in the Coronavirus Membrane Protein Tail is Important for Virus Assembly** Journal of Virology: 11418–11428

Banerjee S., Narayanan K., Mizutani T., Makino S. (2002) **Murine Coronavirus Replication-Induced p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Promotes Interleukin-6 Production and Virus Replication in Cultured** Cells Journal of Virology: 5937–5948

Banerjee S., An S., Zhou A., Silverman R.H., Makino S. (2000) **RNase L-Independent Specific 28S rRNA Cleavage in Murine Coronavirus-Infected Cells** Journal of Virology: 8793–8802

Baudoux P., Carrat C., Besnardeau L., Charley B., Laude H. (1998) **Coronavirus Pseudoparticles Formed with Recombinant M and E Proteins Induce Alpha Interferon Synthesis by Leukocytes** Journal of Virology, 72 (11): 8636–8643

Berger M. und Schmidt M.F.G. (1985) **Protein fatty acyltransferase is located in the rough endoplasmic reticulum** FEBS letters, 187 (2): 289-294

Berger M. und Schmidt M.F.G. (1984b) **Cell-free Fatty Acid Acylation of Semliki Forest Viral Polypeptides with Microsomal Membranes from Eukaryotic Cells** The Journal of Biological Chemistry, 259 (11): 7245-7252

Berger M. und Schmidt M.F.G. (1984a) **Identification of acyl donors and acceptor proteins for fatty acid acylation in BHK cells infected with Semliki Forest virus** The EMBO Joumal, 3 (4): 713-719

Bijlmakers M.J. und Marsh M. (2003) **The on–off story of protein palmitoylation** Trends in Cell Biology,13 (1): 32-42

Blanc M., Blaskovic S., van der Goot F.G. (2013) **Palmitoylation, pathogens and their host Biochemical Society Transactions**, 41 (1): 84-88

Blanpain C., Wittamer V., Vanderwinden J.M., Boom A., Renneboog B., Lee B., Le Poul E., El Asmar L., Govaerts C., Vassart G, Doms R.W., Parmentier M. (2001) **Palmitoylation of CCR5 Is Critical for Receptor Trafficking and Efficient Activation of Intracellular Signaling Pathways** J. Biol. Chem., 276: 23795-23804

Blaskovic S., Blanc M., van der Goot F.G. (2013) **What does S-palmitoylation do to membrane proteins?** FEBS Journal, 280: 2766–2774

Bonatti S., Migliaccio G., Simons K. (1989) **Palmitylation of Viral Membrane Glycoproteins Takes Place after Exit from the Endoplasmic Reticulum*** The Journal of Biological Chemistry, 264 (21): 12590-12595

Bonifacino J.S. und Dell'Angelica E.C. (1999) **Molecular Bases for the Recognition of Tyrosine-based Sorting Signals** The Journal of Cell Biology,145 (5): 923-926

Booth A.M., Fang Y., Fallon J.K., Yang J.R., Hildreth J.E.K., Gould S.J. (2007) **Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane** The Journal of Cell Biology,172 (6): 923–935

Bos E.C.W., Luytjes W., Spaan W.J.M., Bos E. C. W. (1997) **A Subgenomic mRNA Transcript of the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Defective Interfering (DI) RNA Is Packaged When It Contains the DI Packaging Signal** Journal of Virology, 71 (7): 5684–5687

Bos E.C.W., Heijnen L., Luytjes W., Spaan W.J.M. (1995) **Mutational Analysis of the Murine Coronavirus Spike Protein: Effect on Cell-to-Cell Fusion** Virology, 214: 453–463

Boscarino J.A., Logan H.L., Lacny J.J., Gallagher T.M. (2008) **Envelope Protein Palmitoylations Are Crucial for Murine Coronavirus Assembly** Journal of Virology, 82 (6): 2989–2999

Bosch B.J., de Haan C.A.M, Smits S.L., Rottier B.J.M. (2005) **Spike protein assembly into the coronavirion: Exploring the limits of its sequence requirements** Virology, 334: 306–318

Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A.M, Rottier P.J.M. (2003) **The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex** Journal of Virology, 77 (16): 8801–8811

Bost A.G., Prentice E., Denison M.R. (2001) **Mouse Hepatitis Virus Replicase Protein Complexes Are Translocated to Sites of M Protein Accumulation in the ERGIC at Late Times of Infection** Virology 285: 21-29

Bowie J.U. (1997) **Helix Packing in Membrane Proteins** J. Mol. Biol.,272: 780-789

Brian D.A., Baric R.S. (2005) **Coronavirus genome structure and replication** In: Coronavirus Replication and reverse genetics Enjuanes S.1-30, Enjuanes L., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Broer R., Boson B., Spaan W., Cosset F.C., Corver J. (2006) **Important Role for the Transmembrane Domain of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein during Entry** Journal of Virology, 80 (3): 1302–1310

Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. (1994) **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion** Nature, 371: 37-43

Cabellero M., Carabana J., Ortego J., Fernández-Munoz R., Celma M.L. (1998) **Measles Virus Fusion Protein Is Palmitoylated on Transmembrane-Intracytoplasmic Cysteine Residues Which Participate in Cell Fusion** Journal of Virology, 72 (10): 8198–8204

Callebaut P., Correa I., Pensaert M., Jiminez G., Enjuanes G. (1988) **Antigenic Differentiation between Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine and a Related Porcine Respiratory Coronavirus** J. gen. Virol., 69: 1725-1730.

Cathomen T., Buchholz C.J., Spielhofer P., Cattaneo R. (1995) **Preferential Initiation at the Second AUG of the Measles Virus F mRNA: A Role for the Long Untranslated Region** Virology, 214: 628–632

Cavanagh D. (1995) **The coronavirus surface glycoprotein** In: The Coronaviridae S. 73-103, Siddell S. G., Plenum Press, New York

Cavanagh D. (1983) **Coronavirus IBV: Structural Characterization of the Spike Protein** J. gen. Virol., 64: 2577-2583.

Chae C., Kim O., Choi C., Min K. Cho W.S., Kim J., Thai J.H. (2000) **Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs** Veterinary Record, 147: 606-608

Chan W.E., Lin H.H., Chen S.S.L. (2005) **Wild-Type-Like Viral Replication Potential of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Mutants Lacking Palmitoylation Signals** Journal of Virology, 79 (13): 8374–8387

Chan D.C., Fass D., Berger J.M., Kim P.S. (1997) **Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein** Cell, 89: 263–273

Chang C.K., Hou M.H., Chang C.F., Hsiao C.D., Huang T.H. (2014) **The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions** Antiviral Research, 103: 39–50

Chang C.K., Hsu Y.L., Chang Y.H., Chao F.A., Wu M.C., Huang Y.S., Hu C.K., Huang T.H. (2009) **Multiple Nucleic Acid Binding Sites and Intrinsic Disorder of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein: Implications for Ribonucleocapsid Protein Packaging** Journal of Virology, 83 (5): 2255–2264

Chang K.W., Sheng Y., Gombold J.L. (2000) **Coronavirus-Induced Membrane Fusion Requires the Cysteine-Rich Domain in the Spike Protein** Virology 269, 212-224

Charollais J. und van der Goot F.G. (2009) **Palmitoylation of membrane proteins (Review)** Molecular Membrane Biology, 26 (1-2): 55-66

Cheever F.S., Daniels J.B., Pappenheimer A.M., Bailey O.T. (1949) **A murine virus (JHM) causing disseminated encephalotmyelitis with extensive destruction of myelin** J Exp Med., 90 (3): 181-210

Chen C.Y., Chang C.K., Chang Y.W., Sue S.C., Bai H.I., Riang L., Hsiao C.D., Huang T.H. (2007) **Structure of the SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein RNA-binding Dimerization Domain Suggests a Mechanism for Helical Packaging of Viral RNA** J. Mol. Biol., 368: 1075–1086

Chen S.H., Lo S.Y., Ma H.C., Li H.C. (2009) **Expression and membrane integration of SARS-CoV E protein and its interaction with M protein** Virus Genes, 38:365–371

Cohen J.R., Lin L.D., Machamer C.E. (2011) **Identification of a Golgi Complex-Targeting Signal in the Cytoplasmic Tail of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Envelope Protein** Journal of Virology, 85 (12): 5794–5803

Cools J., Mentens N., Marynen P. (2001) **A new family of small, palmitoylated, membrane-associated proteins,characterized by the presence of a cysteine-rich hydrophobic motif1** FEBS Letters 49: 204-209

Corse E. und Machamer C.E. (2003) **The cytoplasmic tails of infectious bronchitis virus E and M proteins mediate their interaction** Virology, 312: 25–34

Corse E. und Machamer C.E. (2002) **The Cytoplasmic Tail of Infectious Bronchitis Virus E Protein Directs Golgi Targeting** Journal of Virology, 76 (3): 1273–1284

Corse E. und Machamer C.E. (2000) **Infectious bronchitis virus E-Protein is targeted to the golgi complex and directs release of virus-like particles** Journal of Virology, 74 (9): 4319-4326

Cox E., Hooyberghs J., Pensaert M.B. (1990) **Site of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus** Res. Vet. Sci., 48:165-9

Curtis K.M., Yount B., Baric R.S. (2002) **Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles** Journal of Virology, 76 (3): 1422–1434

DeDiego M.L., Alvarez E., Almazan F.,Rejas M.T., Lamirande E., Roberts A., Shieh W.J., Zaki S.R., Subbarao K., Enjuanes L. (2007) **A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo** Journal of Virology, 81 (4): 1701-1713

De Haan C.A.M. und Rottier P.J.M. (2005) **Molecular interactions in the assembly of coronaviruses** In: Advances in virus research S. 165-230, Roy P., Volume 64, Elsevier Academic Press

De Haan C.A.M., Stadler K., Godeke G.J., Bosch B.J., Rottier P.J.M. (2004) **Cleavage Inhibition of the Murine Coronavirus Spike Protein by a Furin-Like Enzyme Affects Cell-Cell but Not Virus-Cell Fusion** Journal of Virology, 78 (11): 6048-6054

De Haan C.A.M., Vennema H., Rottier J.M. (2000) **Assembly of the Coronavirus Envelope: Homotypic Interactions between the M Proteins** Journal of Virology, 74 (11) : 4967–4978

De Haan C.A.M, Smeets M., Vernooij F., Vennema H., Rottier P.J.M. (1999) **Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein** Journal of Virology, 73 (9): 7441–7452

De Haan C.A.M., Kuo L., Masters P.S., Vennema H., Rottier P.J.M. (1998) **Coronavirus Particle Assembly: Primary Structure Requirements of the Membrane Protein** Journal of Virology, 72 (8): 6838–6850

Dekker FJ, Rocks O., Vartak N., Menninger S., Hedberg C., Balamurugan R., Wetzel S., Renner S., Gerauer M., Schölermann B., Rusch M., Kramer JW., Rauh D., Coates GW., Brunsveld L., Bastiaens PI., Waldmann H. (2010) **Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling**. Nat Chem Biol., 6(6):449-56.

Delmas B., Gelfi J., L'Hardion R., Vogel L.K., Sjöström H., Norén O., Laude H. (1992) **Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV** Nature, Vol. 357: 417-419

Delmas B. und Laude H. (1990) **Assembly of coronavirus spike-protein into trimers and its role in epitope expression** Journal of Virology, 64 (11): 5367-5375

Dominguez S.R., O'Shea T.J., Oko L.M., Holmes K.V. (2007) **Detection of Group 1 Coronaviruses in Bats in North America** Emerging Infectious Diseases, 13 (9): 1295-1300

Doyle L. P. und Hutching L. M. (1946) **A transmissible gastroenteritis in pigs** J. Am. Vet. Med. Assoc., 108: 257-59

Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H-R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A.M., Berger A., Burguière A-M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Müller S., Rickerts V., Stürmer M., Vieth S., Klenk H.-D., Osterhaus A.D.M.E, Schmitz H., Doerr H.W. (2003) **Identification of a novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome** N Engl J Med, 348:1967-76.

Duncan J.A. und Gilman A.G. (1998) **A Cytoplasmic Acyl-Protein Thioesterase That Removes Palmitate from G Protein a Subunits and p21RAS** The journal of Biological Chemistry, 273 (25): 15830–15837

Duncan J.A. und Gilman A.G. (1996) **Autoacylation of G Protein a Subunits** The Journal of Biological Chemistry, 271 (38): 23594–23600

Dveksler G.S., Pensiero M.N., Cardellichio C.B., Williams R.K., Jiang G.S., Holmes K.V., Dieffenbach C.W. (1991) **Cloning of the Mouse Hepatitis Virus (MHV) Receptor: Expression in Human and Hamster Cell Lines Confers Susceptibility to MHV** Journal of Virology, 65 (12): 6881-6891

Elliott R., Li F., Dragomir I., Chua M.M.W., Gregory B.D., Weiss S.R. (2013) **Analysis of the Host Transcriptome from Demyelinating Spinal Cord of Murine Coronavirus-Infected Mice** Plos One, 8 (9) e75346: 1-16

Enjuanes L. und van der Zeijst B. (1995) **Molecular basis of transmissible gastroenteritis virus epidemiology**. In Siddell S.G. The Coronaviridae, S. 337-376, Plenum Press, New York

Escors D. et al. (2001a) **Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane-protein topologies within the virion and core** Journal of Virology, 75 (24): 12228-12240

Escors D., Camafeita E., Ortego J., Laude H., Enjuanes L. (2001b) **The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability** Journal of Virology, 75 (3): 1312–1324

Faergeman N.J. und Knudsen J. (1997) **Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling** Biochemical Journal, 323: 1-12

Fang Y., Wu N., Gan X., Yan W., Morrell J.C., Gould S.J. (2007) **Higher-Order Oligomerization Targets Plasma Membrane Proteins and HIV Gag to Exosomes** Plos Biology 5 (6): 1267-1283

Feig C., Tchikov V., Schütze S., Peter M.E. (2007) **Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling** The EMBO Journal (2007) 26, 221–231

Fischer F., Stegen C.F., Masters P.S., Samsonoff W.A. (1998) **Analysis of constructed E gene mutants of mouse hepatitis virus confirms a pivotal role for E-Protein in coronavirus assembly** Journal of Virology, 72 (10): 7885-7894

Gaedigk-Nitschko K., Ding M.X., Levy M.A., Schlesinger M.J. (1990) **Site-directed mutations in the Sindbis virus 6K protein reveal sites for fatty acylation and the underacylated protein affects virus release and virion structure** Virology, 175 (1): 282-91

Gallagher T.M., Escarmis C., Buchmeier M.J. (1991) **Alteration of the pH Dependence of Coronavirus-Induced Cell Fusion: Effect of Mutations in the Spike Glycoproteint** Journal of Virology, 65 (4): 1916-1928

Garwes D. J. und Pocock D. H. (1975) **The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus** J. gen. Virol., 29: 25-34

Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Göttsche M., Panning M., Drexler J.F., Petersen N., Annan A., Grywna K., Müller M., Pfefferle S., Drosten C. (2008) **Detection and Prevalence Patterns of Group I Coronaviruses in Bats, Northern Germany** Emerging Infectious Diseases, 14 (4): 626-631

Godet M., L'Haridon R., Vautherot J.F., Laude H. (1992) **TGEV Corona Virus ORF4 Encodes a Membrane Protein That Is Incorporated into Virions** Virology, 188: 666-675

Granger B.L., Greens S.A., Gabeln C.A., Howe C.L., Mellman I., Helenius A. (1990) **Characterization and Cloning of lgpll0, a Lysosomal Membrane Glycoprotein from Mouse and Rat Cells** The Journal of Biological Chemistry, 265 (20): 12036 12043

Greaves J. und Chamberlain L.H. (2007) **Palmitoylation-dependent protein sorting** The Journal of Cell Biology, 176 (3): 249–254

Gundersen C.B., Mastrogiacomo A., Faull K., Umbach J.A. (1994) **Extensive Lipidation of a Torpedo Cysteine String Protein** The Journal of Biological Chemistry, 269 (30): 19197-19199

Hansen G.H., Delmas B., Besnardeau L., Vogel L.K., Laude H. Sjöström H., Norén O. (1998) **The Coronavirus Transmissible Gastroenteritis Virus Causes Infection after Receptor-Mediated Endocytosis and Acid-Dependent Fusion with an Intracellular Compartment** Journal of Virology, 72 (1): 527–534

Hayashi T. und Fujimoto M. (2010) **Detergent-Resistant Microdomains Determine the Localization of σ-1 Receptors to the Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Junction** Molecular Pharmacology, 77: 517–528

He R., Leeson A., Ballantine M., Andonov A., Baker L., Dobie F., Li Y., Bastien N., Feldmann H., Strocher U., Theriault S., Cutts T., Caoa J.,Booth T.F. Plummera F.A., Tyler S., Li X. (2004) **Characterization of protein–protein interactions between the nucleocapsid protein and membrane protein of the SARS coronavirus** Virus Research, 105: 121–125

Heakal Y., Woll M.P., Fox T., Seaton K., Levenson R., Kester M. (2011) **Neurotensin receptor-1 inducible palmitoylation is required for efficient receptor-mediated mitogenic-signaling within structured membrane microdomains** Cancer Biology & Therapy, 12 (5): 427-435

Heald-Sargent T. und Gallagher T. (2012) **Ready, Set, Fuse! The Coronavirus Spike Protein and Acquisition of Fusion Competence** Viruses, 4: 557-580

Heikkinen T. und Järvinen A. (2003) **The Common cold** Lancet, 361: 51–59

Hemmila E., Turbide C., OlsonM. , Jothy S., , Holmes K.V., Beauchemin N. (2004) **Ceacam1a -/- Mice Are Completely Resistant to Infection by Murine Coronavirus Mouse Hepatitis Virus A59** Journal of Virology, 78 (18): 10156–10165

Henis Y.I., Hancock J.F., Prior I.A. (2009) **Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review)** Mol Membr Biol. 2009 January ; 26(1): 80–92.

Hicke L. and Dunn R. (2003) **Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin binding proteins** Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,19: 141–72

Hilser V.J. und Thompson E.B. (2007) **Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins** PNAS, 104 (20): 8311–8315

Hoppe A.D., Scott B.L., Welliver T.P., Straight S.W., Swanson J.A., (2013) **N-Way FRET Microscopy of Multiple Protein-Protein Interactions in Live Cells** Plos One, 8 (6):1-15

Hou H.,1, Peter A.T.J., Meiringer C., Subramanian K., Ungermann C. (2009) **Analysis of DHHC Acyltransferases Implies Overlapping Substrate Specificity and a Two-Step Reaction Mechanism** Traffic; 10: 1061–1073

Howe C.L., Granger B.L., Hull M., Green S.A., Gabel C.A., Helenius A., Mellman I. (1988) **Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgpl20): Identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7577-7581

Hsieh P.K., Chang S.C., Huang C.C., Lee T.T., Hsiao C.W., Kou Y.H., Chen I.Y., Chang C.K., Huang T.H., Chang M.F. (2005) **Assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA Packaging Signal into Virus-Like Particles Is Nucleocapsid Dependent** Journal of Virology, 79 (22): 13848–13855

Huang K., Kang H.H., Askew C., Kang R., Sanders S.S., Wan J., Davis N.G., Hayden M.R. (2010) **Palmitoylation and function of glial glutamate transporter-1 is reduced in the YAC128 mouse model of Huntington disease** Neurobiology of Disease, 40: 207–215

Huang Q., Yu L., Petros A.M., Gunasekera A., Liu Z., Xu N., Hajduk P., Mack J., Fesik S.W., Olejniczak E.T. (2004b) **Structure of the N-Terminal RNA-Binding Domain of the SARS CoV Nucleocapsid** Protein Biochemistry, 43: 6059-6063

Huang Y., Yang Z.Y., Kong W.P, Nabel G.J. (2004) **Generation of Synthetic Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Pseudoparticles: Implications for Assembly and Vaccine Production** Journal of Virology, 78 (22): 12557–12565

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), 2014, online: http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp; 2014-02-14

Jacobs L., van der Zeijst B.A.M., Horzinek M.C. (1986) **Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs** Journal of Virology, 57 (3): 1010-1015

Joseph M. und Nagaraj R. (1995) **Interaction of peptides corresponding to fatty acylation sites in proteins with model membranes** The Journal of Biological Chemistry, 270 (28): 16749-16755

Kamitani W., Narayanan K., Huang C., Lokugamage K., Ikegami T., Ito N., Kubo H., Makino S. (2006) **Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 protein suppresses host gene expression by promoting host mRNA degradation** PNAS, 103 (34): 12885–12890

Kim L., Hayes J., Lewis P., Parwani A.V., Chang K.O., Saif L.J. (2000) **Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd** Arch Virol,145: 1133–1147

Kandasamy S.K. und Larson R.G. (2006) **Molecular Dynamics Simulations of Model Trans-Membrane Peptides in Lipid Bilayers: A Systematic Investigation of Hydrophobic Mismatch** Biophysical Journal,90: 2326–2343

King B. und Brian D. A. (1982) **Bovine coronavirus structural proteins** Journal of Virology, 42 (2): 700-707

Klaus J.P., Eisenhauer P., Russo J., Mason A.B., Do D., King B, Taatjes D., Cornillez-Ty C., Boyson J.E., Thali M., Zheng C., Liao L., Yates J.R. III, Zhang B., Ballif B.A., Botten J.W. (2013) **The Intracellular Cargo Receptor ERGIC-53 Is Required for the Production of Infectious Arenavirus, Coronavirus, and Filovirus Particles** Cell Host & Microbe, 14: 522–534

Klumperman J.,Krijnse Locker J., Meijer A., Horzinek M.C., Geuze H.J., Rottier P.J.M. (1994) **Coronavirus M-Proteins accumulate in the golgi complex beyond the site of virion budding** Journal of virology, 68 (10): 6523-6534

Knoops K., Kikkert M., van den Worm S.H.E., Zevenhoven-Dobbe J.C., van der Meer Y., Koster A.J.,Mommaas A., Snijder E.J. (2008) **SARS-Coronavirus Replication Is Supported by a Reticulovesicular Network of Modified Endoplasmic Reticulum** PLoS Biology, 6 (9): 1957-1974

Kobe F., Renner U., Woehler A., Wlodarczyk J., Papusheva E., Bao G., Zeug A., Richter D.W., Neher E., Ponimaskin E. (2008) **Stimulation- and palmitoylation-dependent changes in oligomeric conformation of serotonin 5-HT1A receptorsi** Biochimica et Biophysica Acta, 1783: 1503–1516

Kopecky-Bromberg S.A., Martínez-Sobrido L., Frieman M., Baric R.A., Palese P. (2006) **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, and Nucleocapsid Proteins Function as Interferon Antagonists** Journal of Virology, 81 (2): 548–557

Kordyukova L.V., Serebryakova M.V., Baratova L.A., Veit M. (2010) **Site-specific attachment of palmitate or stearate to cytoplasmic versus transmembrane cysteines is a common feature of viral spike proteins** Virology, 398: 49–56

Krijnse-Locker J., Opstelten D.J.E., Ericsson M., Horzinek M.C., Rottier P.J.M. (1995) **Oligomerization of a trans-golgi/trans-golgi network retained protein occurs in the golgi complex and may be part of its retention** The Journal of Biological Chemistry, 270 (15): 8815-8821

Krijnse-Locker J., Ericsson M, Rottier P.J.M, GrittithsG. (1994) **Characterization of the Budding Compartment of Mouse Hepatitis Virus: Evidence That Transport from the RER to the Golgi Complex Requires only One Vesicular Transport Step** The Journal of Cell Biology, 124 (I & 2):55-70

Krijnse-Locker J., Rose J., Horzinek M.C., Rottier P.J.M. (1992) **Membrane Assembly of the Triple-spanning Coronavirus M Protein** The Journal of Biological Chemistry, 267 (30): 21911-21918

Krijnse-Locker J., Griffithst G., Horzinek M.C., Rottier P.J.M. (1992a) **0-Glycosylation of the Coronavirus M Protein** The Journal of Biological Chemistry, 267 (20): 14094-14101

Krueger D.K., Kelly S.M., Lewicki D.N., Ruffolo R., Gallagher T.M. (2001) **Variations in Disparate Regions of the Murine Coronavirus Spike Protein Impact the Initiation of Membrane Fusion** Journal of Virology, 75 (6): 2792–2802

Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., Tong S., Urbani C., Comer J.A., Lim W., Rollin P.E., Dowell S.F., Ling A.E., Humphrey C.D., Shieh W.J., Guarner J., Paddock C.D., Rota P., Fields B., DeRisi J., Yang J.Y., Cox N., Hughes J.M., LeDuc J.W., Bellini W.J., Anderson L.J., (2003) **A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome** The New England Journal of Medicine, 348 (20): 1953-1966

Kümmel D., Heinemann U., Veit M. (2006) **Unique self-palmitoylation activity of the transport protein particle component Bet3: A mechanism required for protein stability** PNAS, 103 (34): 12701–12706

Kuo L. und Masters P.S. (2003) **The Small Envelope Protein E Is Not Essential for Murine Coronavirus Replication** Journal of Virology, 77 (8): 4597–4608

Kyuwa S., Cohen M., Nelson G., Tahara S.M., Stohlmani S.A. (1994) **Modulation of Cellular Macromolecular Synthesis by Coronavirus: Implication for Pathogenesis** Journal of Virology, 68 (10): 6815-6819

Lakkaraju A.K.K., Abrami L., Lemmin T., Blaskovic S., Kunz B., Kihara A., Dal Peraro M., van der Goot F.G. (2012) **Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome–translocon complex** The EMBO Journal 31: 1823–1835

Lam K.K.Y., Davey M., Sun B., Roth A.F., Davis N.G., Conibear E. (2006) **Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3** The Journal of Cell Biology 174 (1): 19-25

Lanser J.A. und Howard C.R. (I980) **The polypeptides of infectious bronchitis virus (IBV-41 Strain)** J. gen. ViroL, 46: 349-36I

Lau S.K.P., Woo P.C.Y., Li K.S.M., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H.L., Wong S.S.W, Leung S.Y., Chan K.H., Yuen K.Y. (2005) **Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats** PNAS, 102 (39): 14040-14045

Letourneur F., Klausner R.D. (1992) **A Novel Di-Leucine Motif and a Tyrosine-Based Motif Independently Mediate Lysosomal Targeting and Endocytosis of CD3 Chains** Cell, 69: 1143-1157

Levental I., Lingwood D., Grzybek M., Coskun Ü., Simons K. (2010) **Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins** PNAS, 107 (51): 22050-22054

Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J.H., Moore M.J., Luo S., Wong S.K., Huang I.C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W.A., Guan Y., Choe H., Farzan M. (2005) **Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2** The EMBO Journal, 24: 1634–1643

Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. (2003) **Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus** Nature, 426: 450-454

Liao Y., Yuan Q., Torres J., Tam J.P., Liu D.X. (2005) **Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein** Virology, 349: 264-275

Lim K.P. und Liu D.X. (2001) **The missing link in coronavirus assembly** The Journal of Biological Chemistry, 276 (20): 17515-17523

Linder M.E., Deschenes R.J. (2007) **Palmitoylation: policing protein stability and traffic** Nature Reviews, 8: 74-84

Lissenberg A., Vrolijk M.M., van Vliet A.L.W., Langereis M. A., de Groot-Mijnes J.D.F., Rottier P.J.M., de Groot R.J. (2005) **Luxury at a Cost? Recombinant Mouse Hepatitis Viruses Expressing the Accessory Hemagglutinin Esterase Protein Display Reduced Fitness In Vitro** Journal of Virology 79 (24): 15054-15063

Liu R., Wang D., Shi Q., Fu Q., Hizon S., Xiang Y.K. (2012) **Palmitoylation Regulates Intracellular Trafficking of β_2 Adrenergic Receptor/Arrestin/Phosphodiesterase 4D Complexes in Cardiomyocytes** PLOS ONE, 7 (8): 1-13

Lopez L.A., Riffle A.J., Pike S.L., Gardner D., Hogue B.G. (2008) **Importance of Conserved Cysteine Residues in the Coronavirus Envelope Protein** Journal of Virology, 82 (6): 3000-3010

Lorusso A., Decaro N., Schellen P., Rottier P.J.M., Buonavoglia C., Haijema B.J., de Groot R.J. (2008) **Gain, Preservation, and Loss of a Group 1a Coronavirus Accessory Glycoprotein** Journal of Virology, 82 (20): 10312-10317

Lu Y., Neo T.L., Xiang L.D., Tam J.P. (2008) **Importance of SARS-CoV Spike Protein Trp-rich Region in Viral** Infectivity Biochem Biophys Res Commun., 371(3): 356-360

Luo Z. und Weiss S.R. (1998) **Roles in Cell-to-Cell Fusion of Two Conserved Hydrophobic Regions in the Murine Coronavirus Spike Protein** Virology, 244: 483-494

Lynes E.M., Bui M., Yap M.C, Benson M.D., Schneider B., Ellgaard L., Berthiaume L.G., Simmen T. (2012) **Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane** The EMBO Journal, 31: 457-470

Ma G., Feng Y., Gao F., Wang J., Liu C., Li Y. (2005) **Biochemical and biophysical characterization of the transmissible gastroenteritis coronavirus fusion core** Biochemical and Biophysical Research Communications, 337: 1301-1307

Madan V., de Jesus Garcia M., Sanz M.A., Carrasco L. (2005) **Viroporin activity of murine hepatitis virus E protein** FEBS Letters, 579: 3607-3612

Madu I.G., Roth S.L., Belouzard S., Whittaker G.R. (2009) **Characterization of a Highly Conserved Domain within the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein S2 Domain with Characteristics of a Viral Fusion Peptide** Journal of Virology, 83 (15): 7411-7421

Maeda A., Okanon K., Park P.S.H., Lem J., Crouch R.K., Maeda T., Palczewski K. (2010) **Palmitoylation stabilizes unliganded rod opsin** PNAS, 107 (18): 8428-8433

Maeda J., Repass J.F., Maeda A., Makino S. (2000) **Membrane Topology of Coronavirus E Protein** Virology, 281: 163-169

Majeau N., Fromentin R., Savard C., Duval M., Tremblay M.J., Leclerc D. (2009) **Palmitoylation of Hepatitis C Virus Core Protein Is Important for Virion Production** The Journal of Biological Chemistry, 284: 33915-33925.

Mallabiabarrena A., Fresno M., Alarcon B. (1992) **An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3e chain of the T-cell receptor** Nature, 357: 593-596

Martin B.R. und Cravatt B.F. (2009) **Large-Scale Profiling of Protein Palmitoylation in Mammalian Cells** Nat Methods; 6(2): 135-138

Matsuyama S. und Taguchi F. (2009) **Two-Step Conformational Changes in a Coronavirus Envelope Glycoprotein Mediated by Receptor Binding and Proteolysis** Journal of Virology, 83 (11): 11133-11141

McBride C.E., Machamer C.E. (2010a) **A Single Tyrosine in the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Membrane Protein Cytoplasmic Tail Is Important for Efficient Interaction with Spike Protein** Journal of Virology, 84 (4): 1891-1901

McBride C.E., Machamer C.E. (2010b) **Palmitoylation of SARS-CoV S protein is necessary for partitioning into detergent-resistant membranes and cell–cell fusion but not interaction with M protein** Virology, 405: 139-148

McBride C.E., Li J., Machamer C.E. (2007) **The Cytoplasmic Tail of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Contains a Novel Endoplasmic Reticulum Retrieval Signal That Binds COPI and Promotes Interaction with Membrane Protein** Journal of Virology, 81 (5): 2418-2428

McClurkin A.W. (1965) **Studies on Transmissible Gastroenteritis of Swine I. The Isolation and Identification of a Cytopathogenic Virus of Transmissible Gastroenteritis in Primary Swine Kidney Cell Cultures** Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 29: 46-53

Merrick B.A., Dhungana S., Williams J.G., Aloor J.J., Peddada S., Tomer K.B., Fessler M.B. (2011) **Proteomic Profiling of S-acylated Macrophage Proteins Identifies a Role for Palmitoylation in Mitochondrial Targeting of Phospholipid Scramblase 3** Molecular & Cellular Proteomics, 10 (10): 1-13

Mitra K., Ubarretxena-Belandia I., Taguchi T., Warren G., Engelman D.M. (2003) **Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol** PNAS, 101 (12): 4083-4088

Mollner S., Ferreira P., Beck K., Pfeuffer T. (1998) **Nonenzymatic palmitoylation at Cys 3 causes extra-activation of the B-subunit of the stimulatory GTP-binding protein G** Eur. J. Biochem., 257: 236-241

Mueller G.M., Maarouf A.B., Kinlough C.L., Sheng N., Kashlan O.B., Okumura S., Luthy S., Kleyman T.R., Hughey R.P. (2010) **Cys Palmitoylation of the β Subunit Modulates Gating of the Epithelial Sodium Channel** J. Biol. Chem., 285: 30453-30462.

Narayanan K., Maeda A., Maeda J., Makino S. (2000) **Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells** Journal of Virology, 74 (17): 8127–8134

Neuman B.W., Adair B.D., Yoshioka C., Quispe J.D., Orca G., Kuhn P., Milligan R.A., Yeager M., Buchmeier M.J. (2006) **Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy** Journal of Virology, 80 (16): 7918-7928

Nguyen V.P. und Hogue B.G. (1997) **Protein interactions during coronavirus assembly** Journal of Virology, 71 (12): 9278–9284

Nishimura N., Bannykh S., Slabough S., Matteson J., Altschuler Y., Hahn K., Balch W.E. (1999) **A Di-acidic (D*X*E) Code Directs Concentration of Cargo during Export from the Endoplasmic Reticulum** J. Biol. Chem., 274: 15937-15946

Nishimura N., Balch W.E. (1997) **A Di-Acidic Signal Required for Selective Export from the Endoplasmic Reticulum** Science, 277: 556-558

Nyholm T.K.M., Özdirekcan S., Killian J.A. (2007) **How Protein Transmembrane Segments Sense the Lipid Environment** Biochemistry, 46 (6): 1457-1465

Ohno, H., Fournier M.C., Poy G., Bonifacino J.S. (1996) **Structural Determinants of Interaction of Tyrosine-based Sorting Signals with the Adaptor Medium Chains** J. Biol. Chem., 271: 29009-29015

Ohno Y., Kihara A., Sano T., Igarashi Y. (2006) **Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins** Biochimica et Biophysica Acta, 1761: 474-483

Olson E.N., Glaser L., Merlie J.P. (1984) **Alpha and beta subunits of the nicotinic acetylcholine receptor contain covalently bound lipid** J. Biol. Chem., 259: 5364-5367

Ontiveros E., Kuo L., Masters P.S., Perlman S. (2001) **Inactivation of Expression of Gene 4 of Mouse Hepatitis Virus Strain JHM Does Not Affect Virulence in the Murine CNS** Virology, 289: 230-238

Opstelten D.J.E., Raamsman M.J.B., Wolfs K., Horzinek M.C., Rottier P.J.M. (1995) **Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly** The Journal of Cell Biology, 131 (2): 339-349

Opstelten D.J., de Groote P., Horzinek M.C., Vennema H., Rottier P.J. (1993) **Disulfide Bonds in Folding and Transport of Mouse Hepatitis Coronavirus Glycoproteins** Journal of Virology, 67 (12): 7394-7401

Opstelten D.J., Horzinek M.C., Rottier P.J. (1993) **Complex formation between the spike protein and the membrane protein during mouse hepatitis virus assembly** Adv Exp Med Biol.,342: 189-95.

Ortego J., Ceriani J.E., Patiño C., Plana J., Enjuanes L. (2007) **Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway** Virology, 368: 296-308

Ortego J., Escors D., Laude H., Enjuanes L (2002) **Generation of a Replication-Competent, Propagation-Deficient Virus Vector Based on the Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Genome** Journal of Virology, 76 (22): 11518-11529

Owen D.J., Evans P.R. (1998) **A Structural Explanation for the Recognition of Tyrosine-Based Endocytotic Signals** Science, 282: 1327-1332

Pan J., Lai C.B., Scott W.R.P., Straus S.K. (2010) **Synthetic Fusion Peptides of Tick-Borne Encephalitis Virus as Models for Membrane Fusion** Biochemistry, 49: 287-296

Parthasarathy K., Ng L., Lin X., LiuD.X., Pervushin K., Gong X., Torres J. (2008) **Structural Flexibility of the Pentameric SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel** Biophysical Journal, 95 (6): L39-41

Paul A., Trincone A., Siewert S., Herrler G., Schwegmann-Weßels C. (2014) **A lysine-methionine exchange in a coronavirus surface protein transforms a retention motif into an endocytosis signal** Biol Chem., 395 (6): 657-65.

Peiris S.M., Lai S.T., Poon L.L.M, Guan Y., Yam L.Y.C., Lim W., Nicholls J., Yee W.K.S., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang D.N.C., Yung R.W.H., Ng T.K., Yuen K.Y. (2003) **Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome** Lancet; 361: 1319–25.

Pensaert M., Callebaut P., Vergote J. (1986) **Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis** The Veterinary Quarterly, 8 (3): 257-261

Percherancier Y., Planchenault T., Valenzuela-Fernandez A., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., Bachelerie F. (2001) **Palmitoylation-dependent Control of Degradation, Life Span, and Membrane Expression of the CCR5 Receptor** J. Biol. Chem. 276 (34): 31936-31944

Perlman S. (2013) **The Middle East Respiratory Syndrome—How Worried Should We Be?** MBio, 4 (4): 1-4

Perlman S., Netland J. (2009) **Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis** Nature Reviews Microbiology, 7: 439-450

Pervushin K., Tan E., Parthasarathy K., Lin X., Jiang F.L., Yu D., Vararattanavech A., Soong T.W., Liu D.X., Torres J. (2009) **Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel** PLoS Pathogens, 5 (7): 1-14

Petit C.M., Chouljenko V.N., Iyer A., Colgrove R., Farzan M., Knipe D.M., Kousoulas K.G. (2007) **Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS – coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion** Virology, 360: 264-274

Phillips J.J., Chua M.M., Lavi E. (1999) **Weiss S.R. Pathogenesis of Chimeric MHV4/MHV-A59 Recombinant Viruses: the Murine Coronavirus Spike Protein Is a Major Determinant of Neurovirulence** Journal of Virology, 73 (9): 7752-7760

Pritchard G.C., Paton D.J., Wibberly G., Ibrata G. (1999) **Transmissible gastroenteritis and porcine epidemic diarrhoea in Britain** Veterinary Record, 144: 616-618

Pritchett-Corning K.R., Cosentino J., Clifford C.B. (2009) **Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats** Laboratory Animals, 43: 165-173

Raamsman M.J.B., Locker J.K., de Hooge A., de Vries A.A.F., Griffiths G., Vennema H., Rottier P.J.M. (2000) **Characterization of the Coronavirus Mouse Hepatitis Virus Strain A59 Small Membrane Protein E** Journal of Virology, 74 (5): 2333-2342

Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkmann R., Muth D., Demmers J.A., Zaki A., Fouchier R.A., Thiel V., Drosten C. Rottier P.J., Osterhaus A.D., Bosch B.J., Haagmans B.L. (2013) **Diptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC** Nature, 495 (7440): 251-254

Rasschaert D., Duarte M., Laude H. (1990) **Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions** Journal of General Virology, 71: 2599-2607

Riley S., Fraser C., Donnelly C.A., Ghani A.C., Abu-Raddad L.J., Hedley A.J., Leung G.M., Ho L.M., Lam T.H., Thach T.Q., Chau P., Chan K.P., Lo S.V., Leung P.Y., Tsang T., Ho W., Lee K.H., Lau E.M.C., Ferguson N.M., Anderson R.M. (2003) **Transmission Dynamics of the Etiological Agent of SARS in Hong Kong: Impact of Public Health Interventions** Science, 300: 1961-1966

Risco C., Antón I.M., Enjuanes L., Carrascosa J.L. (1996) **The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins** Journal of Virology, 70 (7): 4773–4777

Risco C., Antón I.M., Sune C., Pedregosa A.M., Martin-Alonso J.M., Parra F., Carrascosa J.L., Enjuanes L. (1995) **Membrane Protein Molecules of Transmissible Gastroenteritis Coronavirus Also Expose the Carboxy-Terminal Region on the External Surface of the Virion** Journal of Virology, 69 (9): 5269–5277

Rohrer J., Schweizer A., Russell D., Kornfeld S. (1996) **The Targeting of Lampl to Lysosomes Is Dependent on the Spacing of its Cytoplasmic Tail Tyrosine Sorting Motif Relative to the Membrane** The Journal of Cell Biology, 132 (4): 565-576

Roth A.F., Wan J., Bailey A.O., Sun B., Kuchar J.A., Green W.N., Phinney B.S., Yates J.R., Davis N.G. (2006) **Global Analysis of Protein Palmitoylation in Yeast** Cell 125: 1003-1013

Rottier P.J.M (1995) **The coronavirus membrane glycoprotein** In: The Coronaviridae S. 115-135, Siddell S. G., Plenum Press, New York

Rottier P.J.M. und Rose K. (1987) **Coronavirus El Glycoprotein Expressed from Cloned cDNA Localizes in the Golgi Region** Journal of Virology, 61 (6): 2042-2045

Rottier P.J.M., Horzinek M.C., van der Zeijst B.A.M. (1982) **Viral Protein Synthesis in Mouse Hepatitis Virus Strain A59-Infected Cells: Effect of Tunicamycin** Journal of Virology, 40 (2): 350-357

Rottier P.J.M., Horzinek M.C., van der Zeijst B.A.M (1981) **Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59-infected cells: effect of tunicamycin** Journal of Virology, 40 (2): p. 350-357

Rousso I., Mixon M.B., Chen B.K., Kim P.S. (2000) **Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity** PNAS, 97 (25): 13523–13525

Ruch T.R. und Machamer C.E. (2011) **The Hydrophobic Domain of Infectious Bronchitis Virus E Protein Alters the Host Secretory Pathway and Is Important for Release of Infectious Virus** Journal of Virology, 85 (2): 675–685

Sachs A.B., Sarnow P., Hentze M.W. (1997) **Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes** Cell, 89: 831–838,

Saif L.J., Pensaert M.B., Sestak K., Yeo S.G., Jung K. (2012) **Coronaviruses.** In: Diseases of Swine S. 501-524, Zimmerman J.J. et al, 10. Auflage, John Wiley & Sons

Saif L.J. und Sestak K. (2006) **Transmissible gastroenteritis and porcine respiratory coronavirus** In: Diseases of Swine S. 489-516, Straw B. E. et al., 9. Auflage, Blackwell Publishing

Salanueva I.J., Carrascosa J.L., Risco C. (1999) **Structural Maturation of the Transmissible Gastroenteritis Coronavirus** Journal of Virology, 73 (10):7952–7964

Sánchez C. M., Izeta A., Sánchez-Morgado S.M., Alonso S., Sola I., Balasch M., Plana-DuranJ.,Enjuaes L. (1999) **Targeted recombination demonstrates that the spike Gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence Journal** of Virology, 73 (9): 7607–7618

Sánchez C. M., Gebauer F., Suni C., Mendez A., Dopazo J., Enjuanes (1992) **Genetic Evolution and Tropism of Transmissible Gastroenteritis Coronaviruses** Virology, 190: 92-105

Sawicki S.G. und Sawicki D.L. (2005) **Coronavirus Transcription: A Perspective.** In: Coronavirus Replication and reverse genetics Enjuanes S.31-55, Enjuanes L., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Sawicki S.G. und Sawicki D.L. (1998) **A new model for coronavirus transcription** Adv Exp Med Biol., 440: 215-9.

Schmid S.L. (1997) **Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An integrated process** Annu. Rev. Biochem., 66: 511–48

Schmidt M., Schmidt M.F.G., Rott R. (1988) **Chemical Identification of Cysteine as Palmitoylation Site in a Transmembrane Protein (Semliki Forest Virus El)** The Journal of Biological Chemistry, 263 (35): 18636-18639

Schmidt M.F.G. und Schlesinger M.J. (1980) **Relation of Fatty Acid Attachment to theT ranslation and Maturation of Vesicular Stomatitis and Sindbis Virus membrane glycoproteins** The Journal of Biological Chemistry, 255 (8): 3334-3339

Schwegmann-Wessels C., Al-Falah M., Escors D., Wang Z., Zimmer G., Deng H., Enjuanes L., Naim H.Y., Herrler G. (2004) **A novel sorting signal for intracellular localization is present in the S-Protein of a porcine coronavirus but absent from severe acute respiratory syndrome-associated coronvirus** The Journal of Biological Chemistry, 279 (42): 43661-43666

Senes A., Gerstein M., Engelman D.M. (2000) **Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The GxxxG Motif Occurs Frequently and in Association with b-branched Residues at Neighboring Positions** J. Mol. Biol., 296: 921-936*

Sethna P.B., Hung S.L., Brian D.A. (1989) **Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons** Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 86: 5626-5630,

Sevier C.S, Weisz O.A., Davis M., Machamer C.E. (2000) **Efficient Export of the Vesicular Stomatitis Virus G Protein from the Endoplasmic Reticulum Requires a Signal in the Cytoplasmic Tail That Includes Both Tyrosine-based and Di-acidic Motifs** Molecular Biology of the Cell, 11: 13–22

Shahinian S. und Silvius J.R. (1995) **Doubly-Lipid-Modified Protein Sequence Motifs Exhibit Long-Lived Anchorage to Lipid Bilayer Membranes?** Biochemistry, 34: 3813-3822

Sharma C., Rabinovitz I., Hemler M.E. (2012) **Palmitoylation by DHHC3 is critical for the function, expression, and stability of integrin α6β4** Cell. Mol. Life Sci. (2012) 69:2233–2244

Shawhan K.*, Siewert S.*, Almazan F., Enjuanes L., Herrler G., Schwegmann-Weßels C. (*contributed equally to this work). **Infectivity of an Alphacoronavirus depends on the tyrosine-based sorting motif in its S protein cytoplasmic domain.** (in Vorbereitung)

Shulla A. und Gallagher T. (2009) **Role of Spike Protein Endodomains in Regulating Coronavirus Entry** The Journal of Biological Chemistry, 284 (47): 32725–32734

Smith H.C. (1956) **Advances made in swine practice.** In S. Veterinary Medicine, 51: 425-426,

Snijder E.J., van der Meer Y., Zevenhoven-Dobbe J., Onderwater J.J.M., van der Meulen J., Koerten H.K., Mommaas M. (2006) **Ultrastructure and Origin of Membrane Vesicles Associated with the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Replication Complex** Journal of Virology, 80 (12): 5927–5940

Sötkamp D. (2009) **Characterization of the interaction between TGEV spike and membrane proteins** Masterarbeit, Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Song H.D., Tub C.C., Zhanga G.W.,Wang S.Y., Zhenge K., Leic L.C., Chene Q.X., Gaoc Y.W., Zhoue H.Q., Xiang H. et al. (2005) **Cross-host evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus in palm civet and human** PNAS, 102 (7): 72430–2435

Stadler K., Masignani V., Eickmann M., Becker S., Abrignani S., Klenk H.D., Rappuoli R.. (2003) **SARS–Beginning to understand a new virus** Nature Reviews-Microbiology, 1: 209-218

Stern D.F. und Sefton B.M. (1982) **Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins** Journal of Virology, 44 (3): 804-812

Sticht J., Humbert M., Findlow S., Bodem J., Müller B., Dietrich U., Werner J., Kräusslich H.G. (2005) **A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro** Nature Structural & Molecular Biology, 12 (8): 671-677

Sturman L.S., Ricard C.S., Holmes K.V. (1985) **Proteolytic Cleavage of the E2 Glycoprotein of Murine Coronavirus: Activation of Cell-Fusing Activity of Virions by Trypsin and Separation of Two Different 90K Cleavage Fragments** Journal of Virology, 56 (3): 904-911

Sturman L.S., Holmes K.V., Behnke J. (1980) **Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nukleokapsid** Journal of Virology, 33 (1): 449-462

Tahara S.M., Dietlin T.A., Bergmann C.C., Nelson G.W., Kyuwa S., Anthony R.P. Stohlman S. (1994) **Coronavirus translational regulation: Leader affects mRNA efficiency** Virology, 202: 621-630

Takeda M., Chang C.K., Ikeya T., Güntert P., Chang Y.H.,Hsu Y.I., Huang T.H., Kainosho M. (2008) **Solution Structure of the C-terminal Dimerization Domain of SARS Coronavirus Nucleocapsid Protein Solved by the SAIL-NMR Method** J. Mol. Biol., 380: 608–622

Thomas D.C. und Roth M.G. (1994) **The Basolateral Targeting Signal in the Cytoplasmic Domain of Glycoprotein G from Vesicular Stomatitis Virus Resembles a Variety of Intracellular Targeting Motifs Related by Primary Sequence but Having Diverse Targeting Activities** Journal of Biological Chemistry, 269 (22): 15732-15739

Thorne R.F., Ralston K.J., de Bock C.E., Mhaidat N.M., Zhang X.D., Boyd A.W., Burns G.F. (2010) **Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum** Biochimica et Biophysica Acta 1803: 1298–1307

Thorp E.B., Boscarino J.A., Logan H.L., Goletz J.T., Gallagher T.M. (2006) **Palmitoylations on Murine Coronavirus Spike Proteins Are Essential for Virion Assembly and Infectivity** Journal of Virology, 80 (3): 1280–1289

Tong S., Conrardy C., Ruone S., Kuzmin I.V., Guo X., Tao Y., Niezgoda M., Haynes L., Agwanda B., Breiman R.F., Anderson L.J., Rupprecht C.E. (2009) **Detection of Novel SARS-like and Other Coronaviruses in Bats from Kenya** Emerging Infectious Diseases, 15 (3): 482-485

Tooze S.A., Tooze J., Warren G. (1988) **Site of Addition of N-Acetyl-galactosamine to the E1 Glycoprotein of Mouse Hepatitis Virus-A59** The Journal of Cell Biology, 106: 1475-1487

Tooze J., Tooze S., Warren G. (1984) **Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions** Eur J Cell Biol., 33 (2): 281-93.

Torres J., Maheswar U., Parthasarathy K., Ng L., Liu D.X., Gong X. (2007) **Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein** Protein Science, 16: 2065–2071

Torres J., Parthasarathy K., Lin X., Saravanan R., Kukol A., Liu D.X. (2006) **Model of a Putative Pore: The Pentameric a-Helical Bundle of SARS Coronavirus E Protein in Lipid Bilayers** Biophysical Journal, 91: 938–947

Tseng Y.T., Wang S.M., Huang K.J., Lee A.I.R., Chiang C.C., Wang C.T. (2010) **Self-assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus membrane protein** The Journal of Biological Chemistry, 285 (17): 12862–12872

Tyrrell D.A.J. und Bynoe M.L. (1965) **Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ** Cultures British. medical Journal,1: 1467-1470

Ujike M., HuangC., Shirato K., Matsuyama S., Makino S., Taguchi F. (2012) **Two palmitylated cysteine residues of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike (S) protein are critical for S incorporation into virus-like particles, but not for M–S co-localization** Journal of General Virology, 93: 823–828

Ujike M., Nakajima K., Nobusawa E. (2004)**Influence of Acylation Sites of Influenza B Virus Hemagglutinin on Fusion Pore Formation and Dilation** Journal of Virology, 78 (21): 11536–11543

Ulmschneider M.B. und Sansom M.S.P. (2001) **Amino acid distributions in integral membrane protein structures** Biochimica et Biophysica Acta, 1512: 1-14

Vabret A., Dina J., Brison E., Brouard J., Freymuth F. (2009) **Coronavirus humains (HCoV) - Human coronaviruses Pathologie** Biologie, 57: 149–160

Valdez-Taubas J. und Pelham H. (2005) **Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation** The EMBO Journal, 24: 2524–2532

Van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj S., Zaki A.M., Osterhaus A.D.M.E., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchiera R.A.M. (2012) **Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans** MBio, 3 (6) e00473: 1-9

Van Itallie C., Gambling T.M., Carson J.L., Anderson J.M. (2005) **Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization** Journal of Cell Science, 118: 1427-1436

Veit M. (2012) **Palmitoylation of virus proteins** Biology of the Cell, 104: 493–515

Veit M., Klenk H.D., Kendal A., Rott R. (1991) **The M2 protein of influenza A virus is acylated** Journal of General Virology, 72: 1461-1465

Vennema H., Godeke G.J., Rossen J.W.A., Voorhout W.F., Horzinek M.C., Opstelten D.J.E., Rottier P.J.M. (1996) **Nukleokapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope-protein genes** The EMBO Journal, 15 (8): 2020-2028

Vijgen L., Keyaerts E., Moe¨s E., Thoelen I., Wollants E., Lemey P., Vandamme A.M., Van Ranst M. (2005) **Complete Genomic Sequence of Human Coronavirus OC43: Molecular Clock Analysis Suggests a Relatively Recent Zoonotic Coronavirus Transmission Event** Journal of Virology, 79 (3): 1595–1604

Wagner R., Herwig A., Azzouz N., Klenk H.D. (2005) **Acylation-Mediated Membrane Anchoring of Avian Influenza Virus Hemagglutinin Is Essential for Fusion Pore Formation and Virus Infectivity** Journal of Virology, 79 (10): 6449–6458

Wathelet M.G., Orr M., Frieman M.B., Baric R.S. (2007) **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Evades Antiviral Signaling: Role of nsp1 and Rational Design of an Attenuated Strain** Journal of Virology, 81 (21):11620–11633

Webb Y., Hermida-Matsumoto L., Resh M.D. (2000) **Inhibition of Protein Palmitoylation, Raft Localization, and T Cell Signaling by 2-Bromopalmitate and Polyunsaturated Fatty Acids** The Journal of Biological Chemistry, 275 (1): 261–270

Weber C.N. (2006) **Molekulare Determinanten für die Palmitoylierung integraler Membranproteine.** Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, Journal-Nr. 3080

Weissenhorn W., Carfí A., Lee K.H., Skehel J.J., Wiley D.C. (1998) **Crystal Structure of the Ebola Virus Membrane Fusion Subunit, GP2, from the Envelope Glycoprotein Ectodomain** Molecular Cell, 2: 605–616

Whitt M.A. und Rose J.K. (1991) **Fatty acid acylation is not required for membrane fusion activity or glycoprotein assembly into VSV virions** Virology, 185: 875-878

Wigge P. und McMahon H.T. (1998) **The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse** Trends Neurosci., 21: 339–344

Wilson L., Gagec P., Ewartb G (2006) **Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication** Virology, 353: 294–306

Wilson L., Mckinlay C., Gagec P., Ewartb G. (2004) **SARS coronavirus E protein forms cation-selective ion channels** Virology, 330: 322–331

Winter C., Schwegmann-Wessels C., Neumann U., Herrler G. (2008) **The spike protein of infectious bronchitis virus is retained intracellularly by a tyrosine motif** Journal of Virology, 82 (6): 2765–2771

Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. (2010) **Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis** Viruses, 2: 1804-1820

Woo P.C.Y., Wang M., Lau S.K.P., Xu H., Poon R.W.S, Guo R., Wong B.H.L., Gao K., Tsoi H.W., Huang Y., Li K.S.M., Lam C.S.F., Chan K.H., Zheng B., Yuen K.Y. (2007) **Comparative Analysis of Twelve Genomes of Three Novel Group 2c and Group 2d Coronaviruses Reveals Unique Group and Subgroup Features** Journal of Virology, 81 (4): 1574–1585

Wu Z.G.,Yan W.M., Guo W., Chen T., Zou Y., Wang H.W., Wang X.J., Yang X.J., Lu Y.L., Luo P., Ning Q. (2010) **Telbivudine preserves T-helper 1 cytokine production and downregulates programmed death ligand 1 in a mouse model of viral hepatitis** Journal of Viral Hepatitis, 17 (1): 24–33

Xu Y., Zhu J., Liu Y., Lou Z., Yuan F., Liu Y., Cole D.K., Ni L., Su N., Qin L., Li X., Bai Z.H., Bell J.I., Pang H., Tien P., Gao G.F., Rao Z. (2004a) **Characterization of the Heptad Repeat Regions, HR1 and HR2, and Design of a Fusion Core Structure Model of the Spike Protein from Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus** Biochemistry, 43: 14064-14071

Xu Y., Lou Z., Liu Y., Pang H., Tien P., Gao G.F., Rao Z. (2004b) **Crystal Structure of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Fusion Core** The Journal of Biological Chemistry, 279 (47): 49414–49419

Xu Y., Liu Y., Lou Z., Qin L., Li X., Bai Z., Pang H., Tien P., Gao G.F., Rao Z. (2004c) **Structural Basis for Coronavirus-mediated Membrane Fusion** The Journal of Biological Chemistry, 279 (29): 30514–30522

Yamada Y. und Liu D.X. (2009) **Proteolytic Activation of the Spike Protein at a Novel RRRR/S Motif Is Implicated in Furin-Dependent Entry, Syncytium Formation, and Infectivity of Coronavirus Infectious Bronchitis Virus in Cultured Cells** Journal of Virology, 83 (17): 8744–8758

Yang C. und Compans R.W. (1996) **Palmitoylation of the Murine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein Transmembrane Subunits** Virology, 221: 87–97

Yang C., Spies C.P., Compans R.W. (1995) **The human and simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein transmembrane subunits are palmitoylated** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 9871-9875

Yang J., Lv J., Wang Y., Gao S., Yao Q., Qu D., Ye R. (2012) **Replication of murine coronavirus requires multiple cysteines in the endodomain of spike protein** Virology, 427: 98–106

Yang W., Vizio D.D., Kirchner M., Steen H., Freeman M.R. (2010) **Proteome Scale Characterization of Human S-Acylated Proteins in Lipid Raft-enriched and Non-raft Membranes** Molecular & Cellular Proteomics 9: 54–70

Ye Y. und Hogue B.G. (2007) **Role of the Coronavirus E Viroporin Protein Transmembrane Domain in Virus Assembly** Journal of Virology, 81 (7): 3597–3607

Ye R., Montalto-Morrison C., Masters P.S. (2004) **Genetic Analysis of Determinants for Spike Glycoprotein Assembly into Murine Coronavirus Virions: Distinct Roles for Charge-Rich and Cysteine-Rich Regions of the Endodomain** Journal of Virology, 78 (18): 9904–9917

Yik J.H.N. und Weigel P.H. (2002) **The Position of Cysteine Relative to the Transmembrane Domain Is Critical for Palmitoylation of H1, the Major Subunit of the Human Asialoglycoprotein Receptor** The Journal of Biological Chemistry, 277 (49): 47305–47312

Yount B., Roberts R.S., Sims A.C., Deming D., Frieman M.B., Sparks J., Denison M.R., Davis N., Baric R.S. (2005) **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Group-Specific Open Reading Frames Encode Nonessential Functions for Replication in Cell Cultures and Mice** Journal of Virology, 79 (23):14909–14922

Yu L., Takeda K., Markoff L. (2013) **Protein–protein interactions among WestNile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells** Virology, 446: 365–377

Yuan Q., Liaoa Y., Torresa J., Tama J.P., Liua D.X. (2006) **Biochemical evidence for the presence of mixed membrane topologies of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein expressed in mammalian cells** FEBS Letters 580: 3192–3200

Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M. (2012) **Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia** The new england journal of medicine, 367: 1814-20.

Zelus B.D., Schickli J.H., Blau D.M., Weiss S.R., Holmes K.V. (2003) **Conformational Changes in the Spike Glycoprotein of Murine Coronavirus Are Induced at 37°C either by Soluble Murine CEACAM1 Receptors or by pH 8** Journal of Virology 77 (2): 830–840

Zhang H., Curreli F., Waheed A.A., Mercredi P.Y., Mehta M., Bhargava P., Scacalossi D., Tong X., Lee S., Cooper A., Summers M.F., Freed E.O., Debnath A.K. (2013) **Dual-acting stapled peptides target both HIV-1 entry and assembly** Retrovirology, 10 (136): 1-20

Zhao X., Singh M., Malashkevich V.N., Kim P.S. (2000) **Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core** PNAS,97 (26): 14172–14177

Zurcher T., Luo G., Palese P. (1994) **Mutations at Palmitylation Sites of the Influenza Virus Hemagglutinin Affect Virus Formation** Journal of Virology, 68 (9): 5748-5754

Anhang

Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

TGEV (PUR-46 MAD) S-Protein

Nukleotidsequenz (4.344 bp):

```
1     atgaaaaaac tatttgtggt tttggtcgta atgccattga tttatggaga
51    caattttcct tgttctaaat tgactaatag aactataggc aaccagtgga
101   atctcattga aaccttcctt ctaaactata gtagtaggtt accacctaat
151   tcagatgtgg tgttaggtga ttattttcct actgtacaac cttggtttaa
201   ttgcattcgc aatgatagta atgaccttta tgttacactg gaaaatctta
251   aagcattgta ttgggattat gctacagaaa atatcacttg gaatcacaga
301   caacggttaa acgtagtcgt taatggatac ccatactcca tcacagttac
351   aacaacccgc aattttaatt ctgctgaagg tgctattata tgcatttgta
401   agggctcacc acctactacc accacagaat ctagtttgac ttgcaattgg
451   ggtagtgagt gcaggttaaa ccataagttc cctatatgtc cttctaattc
501   agaggcaaat tgtggtaata tgctgtatgg cctacaatgg tttgcagatg
551   aggttgttgc ttatttacat ggtgctagtt accgtattag ttttgaaaat
601   caatggtctg gcactgtcac atttggtgat atgcgtgcga caacattaga
651   agtcgctggc acgcttgtag acctttggtg gtttaatcct gtttatgatg
701   tcagttatta tagggttaat aataaaaatg gtactaccgt agtttccaat
751   tgcactgatc aatgtgctag ttatgtggct aatgttttta ctacacagcc
801   aggaggtttt ataccatcag attttagttt taataattgg ttccttctaa
851   ctaatagctc cacgttggtt agtggtaaat tagttaccaa acagccgtta
901   ttagttaatt gcttatggcc agtccctagc tttgaagaag cagcttctac
951   attttgtttt gagggtgctg gctttgatca atgtaatggt gctgttttaa
1001  ataatactgt agacgtcatt aggttcaacc ttaattttac tacaaatgta
1051  caatcaggta agggtgccac agtgttttca ttgaacacaa cgggtggtgt
1101  cactcttgaa atttcatgtt atacagtgag tgactcgagc tttttcagtt
1151  acggtgaaat tccgttcggc gtaactgatg gaccacggta ctgttacgta
1201  cactataatg gcacagctct taagtattta ggaacattac cacctagtgt
1251  caaggagatt gctattagta agtggggcca tttttatatt aatggttaca
```

```
1301 atttctttag cacatttcct attgattgta tatcttttaa tttgaccact
1351 ggtgatagtg acgttttctg gacaatagct tacacatcgt acactgaagc
1401 attagtacaa gttgaaaaca cagctattac aaaggtgacg tattgtaata
1451 gtcacgttaa taacattaaa tgctctcaaa ttactgctaa tttgaataat
1501 ggattttatc ctgtttcttc aagtgaagtt ggtcttgtca ataagagtgt
1551 tgtgttacta cctagctttt acacacatac cattgttaac ataactattg
1601 gtcttggtat gaagcgtagt ggttatggtc aacccatagc ctcaacatta
1651 agtaacatca cactaccaat gcaggatcac aacaccgatg tgtactgtat
1701 tcgttctgac caattttcag tttatgttca ttctacttgc aaaagtgctt
1751 tatgggacaa tatttttaag cgaaactgca cggacgtttt agatgccaca
1801 gctgttataa aaactggtac ttgtcctttc tcatttgata aattgaacaa
1851 ttacttaact tttaacaagt tctgtttgtc gttgagtcct gttggtgcta
1901 attgtaagtt tgatgtagct gcccgtacaa gaaccaatga gcaggttgtt
1951 agaagtttgt atgtaatata tgaagaagga gacaacatag tgggtgtacc
2001 gtctgataat agtggtgtgc acgatttgtc agtgctacac ctagattcct
2051 gcacagatta caatatatat ggtagaactg gtgttggtat tattagacaa
2101 actaacagga cgctacttag tggcttatat tacacatcac tatcaggtga
2151 tttgttaggt tttaaaaatg ttagtgatgg tgtcatctac tctgtaacgc
2201 catgtgatgt aagcgcacaa gcagctgtta ttgatggtac catagttggg
2251 gctatcactt ccattaacag tgaactgtta ggtctaacac attggacaac
2301 aacacctaat ttttattact actctatata taattacaca aatgatagga
2351 ctcgtggcac tgcaattgac agtaatgatg ttgattgtga acctgtcata
2401 acctattcta acataggtgt ttgtaaaaat ggtgcttttg tttttattaa
2451 cgtcacacat tctgatggag acgtgcaacc aattagcact ggtaatgtca
2501 cgatacctac aaactttacc atatccgtgc aagtcgaata tattcaggtt
2551 tacactacac cagtgtcaat agactgttca agatatgttt gtaatggtaa
2601 ccctaggtgt aacaaattgt taacacaata cgtttctgca tgtcaaacta
2651 ttgagcaagc acttgcaatg ggtgccagac ttgaaaacat ggaggttgat
2701 tccatgttgt ttgtttctga aaatgccctt aaattggcat ctgttgaagc
2751 attcaatagt tcagaaactt tagaccctat ttacaaagaa tggcctaata
2801 taggtggttc ttggctagaa ggtctaaaat acatacttcc gtcccataat
2851 agcaaacgta agtatcgttc agctatagag gacttgcttt ttgataaggt
2901 tgtaacatct ggtttaggta cagttgatga agattataaa cgttgtacag
2951 gtggttatga catagctgac ttagtatgtg ctcaatacta taatggcatc
```

```
3001  atggtgctac ctggtgtggc taatgctgac aaaatgacta tgtacacagc
3051  atcccttgca ggtggtataa cattaggtgc acttggtgga ggcgccgtgg
3101  ctataccttt tgcagtagca gttcaggcta gacttaatta tgttgctcta
3151  caaactgatg tattgaacaa aaaccagcag attctggcta gtgctttcaa
3201  tcaagctatt ggtaacatta cacagtcatt tggtaaggtt aatgatgcta
3251  tacatcaaac atcacgaggt cttgctactg ttgctaaagc attggcaaaa
3301  gtgcaagatg ttgtcaacat acaagggcaa gctttaagcc acctaacagt
3351  acaattgcaa aataatttcc aagccattag tagttctatt agtgacattt
3401  ataataggct tgacgaattg agtgctgatg cacaagttga caggctgatc
3451  acaggaagac ttacagcact taatgcattt gtgtctcaga ctctaaccag
3501  acaagcggag gttagggcta gtagacaact tgccaaagac aaggttaatg
3551  aatgcgttag gtctcagtct cagagattcg gattctgtgg taatggtaca
3601  catttgtttt cactcgcaaa tgcagcacca aatggcatga ttttctttca
3651  cacagtgcta ttaccaacgg cttatgaaac tgtgactgct tggccaggta
3701  tttgtgcttc agatggtgat cgcacttttg gacttgtcgt taaagatgtc
3751  cagttgactt tgtttcgtaa tctagatgac aagttctatt tgacccccag
3801  aactatgtat cagcctagag ttgcaactag ttctgacttt gttcaaattg
3851  aagggtgcga tgtgctgttt gttaatgcaa ctgtaagtga tttgcctagt
3901  attatacctg attatattga tattaatcag actgttcaag acatattaga
3951  aaattttaga ccaaattgga ctgtacctga gttgacattt gacattttta
4001  acgcaaccta tttaaacctg actggtgaaa ttgatgactt agaatttagg
4051  tcagaaaagc tacataacac cactgtagaa cttgccattc tcattgacaa
4101  cattaacaat acattagtca atcttgaatg gctcaataga attgaaacct
4151  atgtaaaatg gccttggtat gtgtggctac taataggctt agtagtaata
4201  ttttgcatac cattactgct attttgctgt tgtagtacag gttgctgtgg
4251  atgcataggt tgtttaggaa gttgttgtca ctctatatgt agtagaagac
4301  aatttgaaaa ttacgaacca attgaaaaag tgcacgtcca ttaa
```

Aminosäuresequenz (1.447 AS):

```
1     MKKLFVVLVV MPLIYGDNFP CSKLTNRTIG NQWNLIETFL LNYSSRLPPN
51    SDVVLGDYFP TVQPWFNCIR NDSNDLYVTL ENLKALYWDY ATENITWNHR
101   QRLNVVVNGY PYSITVTTTR NFNSAEGAII CICKGSPPTT TTESSLTCNW
151   GSECRLNHKF PICPSNSEAN CGNMLYGLQW FADEVVAYLH GASYRISFEN
```

```
201   QWSGTVTFGD MRATTLEVAG TLVDLWWFNP VYDVSYYRVN NKNGTTVVSN
251   CTDQCASYVA NVFTTQPGGF IPSDFSFNNW FLLTNSSTLV SGKLVTKQPL
301   LVNCLWPVPS FEEAASTFCF EGAGFDQCNG AVLNNTVDVI RFNLNFTTNV
351   QSGKGATVFS LNTTGGVTLE ISCYTVSDSS FFSYGEIPFG VTDGPRYCYV
401   HYNGTALKYL GTLPPSVKEI AISKWGHFYI NGYNFFSTFP IDCISFNLTT
451   GDSDVFWTIA YTSYTEALVQ VENTAITKVT YCNSHVNNIK CSQITANLNN
501   GFYPVSSSEV GLVNKSVVLL PSFYTHTIVN ITIGLGMKRS GYGQPIASTL
551   SNITLPMQDH NTDVYCIRSD QFSVYVHSTC KSALWDNIFK RNCTDVLDAT
601   AVIKTGTCPF SFDKLNNYLT FNKFCLSLSP VGANCKFDVA ARTRTNEQVV
651   RSLYVIYEEG DNIVGVPSDN SGVHDLSVLH LDSCTDYNIY GRTGVGIIRQ
701   TNRTLLSGLY YTSLSGDLLG FKNVSDGVIY SVTPCDVSAQ AAVIDGTIVG
751   AITSINSELL GLTHWTTTPN FYYYSIYNYT NDRTRGTAID SNDVDCEPVI
801   TYSNIGVCKN GAFVFINVTH SDGDVQPIST GNVTIPTNFT ISVQVEYIQV
851   YTTPVSIDCS RYVCNGNPRC NKLLTQYVSA CQTIEQALAM GARLENMEVD
901   SMLFVSENAL KLASVEAFNS SETLDPIYKE WPNIGGSWLE GLKYILPSHN
951   SKRKYRSAIE DLLFDKVVTS GLGTVDEDYK RCTGGYDIAD LVCAQYYNGI
1001  MVLPGVANAD KMTMYTASLA GGITLGALGG GAVAIPFAVA VQARLNYVAL
1051  QTDVLNKNQQ ILASAFNQAI GNITQSFGKV NDAIHQTSRG LATVAKALAK
1101  VQDVVNIQGQ ALSHLTVQLQ NNFQAISSSI SDIYNRLDEL SADAQVDRLI
1151  TGRLTALNAF VSQTLTRQAE VRASRQLAKD KVNECVRSQS QRFGFCGNGT
1201  HLFSLANAAP NGMIFFHTVL LPTAYETVTA WPGICASDGD RTFGLVVKDV
1251  QLTLFRNLDD KFYLTPRTMY QPRVATSSDF VQIEGCDVLF VNATVSDLPS
1301  IIPDYIDINQ TVQDILENFR PNWTVPELTF DIFNATYLNL TGEIDDLEFR
1351  SEKLHNTTVE LAILIDNINN TLVNLEWLNR IETYVKWPWY VWLLIGLVVI
1401  FCIPLLLFCC CSTGCCGCIG CLGSCCHSIC SRRQFENYEP IEKVHVH
```

TGEV (PUR-46 MAD) E-Protein

Nukleotidsequenz (249 bp):

```
1     atgacgtttc ctagggcatt gactgtcata gatgacaatg gaatggtcat
51    taacatcatt ttctggttcc tgttgataat tatattgata ttactttcaa
101   tagcattgct aaatataatt aagctatgca tggtgtgttg caatttagga
151   aggacagtta ttattgttcc agcgcaacat gcttacgatg cctataagaa
```

201 ttttatgcga attaaagcat acaaccccga tggagcactc cttgcttga

Aminosäuresequenz (82 AS):

1 MTFPRALTVI DDNGMVINII FWFLLIIILI LLSIALLNII KLCMVCCNLG
51 RTVIIVPAQH AYDAYKNFMR IKAYNPDGAL LA

TGEV (PUR-46 MAD) M-Protein

Nukleotidsequenz (789 bp):

1 atgaagattt tgttaatatt agcgtgtgtg attgcatgcg catgtggaga
51 acgctattgt gctatgaaat ccgatacaga tttgtcatgt cgcaatagta
101 cagcgtctga ttgtgagtca tgcttcaacg gaggcgatct tatttggcat
151 cttgcaaact ggaacttcag ctggtctata atattgatcg tttttataac
201 tgtgctacaa tatggaagac ctcaattcag ctggttcgtg tatggcatta
251 aaatgcttat aatgtggcta ttatggcccg ttgttttggc tcttacgatt
301 tttaatgcat actcggaata ccaagtgtcc agatatgtaa tgttcggctt
351 tagtattgca ggtgcaattg ttacatttgt actctggatt atgtattttg
401 taagatccat tcagttgtac agaaggacta agtcttggtg gtctttcaac
451 cctgaaacta aagcaattct ttgcgttagt gcattaggaa gaagctatgt
501 gcttcctctc gaaggtgtgc caactggtgt cactctaact ttgctttcag
551 ggaatttgta cgctgaaggg ttcaaaattg caggtggtat gaacatcgac
601 aatttaccaa aatacgtaat ggttgcatta cctagcagga ctattgtcta
651 cacacttgtt ggcaagaagt tgaaagcaag tagtgcgact ggatgggctt
701 actatgtaaa atctaaagct ggtgattact caacagaggc aagaactgat
751 aatttgagtg agcaagaaaa attattacat atggtataa

Aminosäuresequenz (262 AS):

1 MKILLILACV IACACGERYC AMKSDTDLSC RNSTASDCES CFNGGDLIWH
51 LANWNFSWSI ILIVFITVLQ YGRPQFSWFV YGIKMLIMWL LWPVVLALTI
101 FNAYSEYQVS RYVMFGFSIA GAIVTFVLWI MYFVRSIQLY RRTKSWWSFN
151 PETKAILCVS ALGRSYVLPL EGVPTGVTLT LLSGNLYAEG FKIAGGMNID
201 NLPKYVMVAL PSRTIVYTLV GKKLKASSAT GWAYYVKSKA GDYSTEARTD
251 NLSEQEKLLH MV

VSV (Strain Indiana) G-Protein

Nukleotidsequenz (1527 bp):

```
1     atgaagtgcc ttttgtactt agccttttta ttcattgggg tgaattgcaa
51    gttcaccata gtttttccac acaaccaaaa aggaaactgg aaaaatgttc
101   cttctaatta ccattattgc ccgtcaagct cagatttaaa ttggcataat
151   gacttaatag gcacagccat acaagtcaaa atgcccaaga gtcacaaggc
201   tattcaagca gacggttgga tgtgtcatgc ttccaaatgg gtcactactt
251   gtgatttccg ctggtatgga ccgaagtata taacacagtc catccgatcc
301   ttcactccat ctgtagaaca atgcaaggaa agcattgaac aaacgaaaca
351   aggaacttgg ctgaatccag gcttccctcc tcaaagttgt ggatatgcaa
401   ctgtgacgga tgccgaagca gtgattgtcc aggtgactcc tcaccatgtg
451   ctggttgatg aatacacagg agaatgggtt gattcacagt tcatcaacgg
501   aaaatgcagc aattacatat gccccactgt ccataactct acaacctggc
551   attctgacta taaggtcaaa gggctatgtg attctaacct catttccatg
601   gacatcacct tcttctcaga ggacggagag ctatcatccc tgggaaagga
651   gggcacaggg ttcagaagta actactttgc ttatgaaact ggaggcaagg
701   cctgcaaaat gcaatactgc aagcattggg gagtcagact cccatcaggt
751   gtctggttcg agatggctga taaggatctc tttgctgcag ccagattccc
801   tgaatgccca gaagggtcaa gtatctctgc tccatctcag acctcagtgg
851   atgtaagtct aattcaggac gttgagagga tcttggatta ttccctctgc
901   caagaaacct ggagcaaaat cagagcgggt cttccaatct ctccagtgga
951   tctcagctat cttgctccta aaaacccagg aaccggtcct gctttcacca
1001  taatcaatgg taccctaaaa tactttgaga ccagatacat cagagtcgat
1051  attgctgctc caatcctctc aagaatggtc ggaatgatca gtggaactac
1101  cacagaaagg gaactgtggg atgactgggc accatatgaa gacgtggaaa
1151  ttggacccaa tggagttctg aggaccagtt caggatataa gtttccttta
1201  tacatgattg gacatggtat gttggactcc gatcttcatc ttagctcaaa
1251  ggctcaggtg ttcgaacatc ctcacattca agacgctgct tcgcaacttc
1301  ctgatgatga gagtttattt tttggtgata ctgggctatc caaaaatcca
1351  atcgagcttg tagaaggttg gttcagtagt tggaaaagct ctattgcctc
1401  tttttcttt atcatagggt taatcattgg actattcttg gttctccgag
1451  ttggtatcca tctttgcatt aaattaaagc acaccaagaa aagacagatt
```

```
1501  tatacagaca tagagatgaa ccgacttgga aagtaa
```

Aminosäuresequenz (508 AS):

```
1     MKCLLYLAFL FIGVNCKFTI VFPHNQKGNW KNVPSNYHYC PSSSDLNWHN
51    DLIGTAIQVK MPKSHKAIQA DGWMCHASKW VTTCDFRWYG PKYITQSIRS
101   FTPSVEQCKE SIEQTKQGTW LNPGFPPQSC GYATVTDAEA VIVQVTPHHV
151   DEYTGEWVDS QFINGKCSNY ICPTVHNSTT WHSDYKVKGL CDSNLISMDI
201   TFFSEDGELS SLGKEGTGFR SNYFAYETGG KACKMQYCKH WGVRLPSGVW
251   FEMADKDLFA AARFPECPEG SSISAPSQTS VDVSLIQDVE RILDYSLCQE
301   TWSKIRAGLP ISPVDLSYLA PKNPGTGPAF TIINGTLKYF ETRYIRVDIA
351   APILSRMVGM ISGTTTEREL WDDWAPYEDV EIGPNGVLRT SSGYKFPLMI
401   GHGMLDSDLH LSSKAQVFEH PHIQDAASQL PDDESLFFGD TGLSKNPIEL
451   VEGWFSSWKS SIASFFFIIG LIIGLFLVLR VGIHLCIKLK HTKKRQIYTD
501   IEMNRLGK
```

HA-Peptid

Nukleotidsequenz (30 bp)

```
1     atgtacccat acgatgttcc agattacgct
```

Aminosäuresequenz (10 AS)

```
1     MYPYDVPDYA
```

Wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen:

Paul A, Trincone A, Siewert S, Herrler G, Schwegmann-Weßels C. (2014) **A lysine-methionine exchange in a coronavirus surface protein transforms a retention motif into an endocytosis signal.** Biol Chem., 395 (6): 657-65.

Gelhaus S*, Shawhan K*, Almazan F, Enjuanes L, Herrler G, Schwegmann-Weßels C (*contributed equally to this work). **Infectivity of an *Alphacoronavirus* depends on the tyrosine-based sorting motif in its S protein cytoplasmic domain.** (Manuskript in Vorbereitung)

Gelhaus S, Thaa B, Eschke K, Veit M, Schwegmann-Weßels C. **Palmitoylation of an *Alphacoronavirus* spike protein is essential for S incorporation but not for S-M interaction.** (Manuskript eingereicht)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen oder Seminaren präsentiert:

Vorträge

Siewert S, Eschke K, Thaa B, Veit M, Schwegmann-Weßels C. Does the cysteine-rich motif of an *Alphacoronavirus* Spike protein play a crucial role in virus assembly? Gesellschaft für Virologie, 23rd Annual Meeting, Kiel, 2013

Schwegmann-Weßels C, Shawan K, Siewert S, Enjuanes L, Herrler G. The tyrosine-based sorting motif of an *alphacoronavirus* S protein is essential for viral infectivity. Gesellschaft für Virologie, 23rd Annual Meeting, Kiel, 2013 (Vortrag durch C. Schwegmann-Weßels)

Shahwan K, Siewert S, Enjuanes L, Herrler G, Schwegmann-Weßels C. Infectivity of an *Alphacoronavirus* depends on the tyrosine-based sorting motif in its S protein cytoplasmic domain. 5th European Congress of Virology, Lyon (France), 2013. (Vortrag durch C. Schwegmann-Weßels)

Siewert S, Thaa B, Eschke K, Schwegmann-Weßels C. Does the cysteine-rich motif of an *Alphacoronavirus* spike protein play a crucial role in virus assembly? Biochemisches und virologisches Seminar der TiHo Hannover, 2013.

Siewert S, Eschke K, Schwegmann-Weßels C. Characterisation of the TGEV spike and membrane protein interaction. Vortrag im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes an der FU Berlin, 2012

Posterpräsentationen

Siewert S, Schwegmann-Weßels C. Is the cysteine-rich motif of an *alpha-coronavirus* Spike protein crucial in virus assembly? Positive Strand RNA Viruses symposium, Boston (USA), 2013

Siewert S, Schwegmann-Weßels C. Coronavirus S-M protein interaction: Does the cysteine-rich region in the S protein play a crucial role? Gesellschaft für Virologie, 22nd Annual Meeting, Essen, 2012

Eschke K, Siewert S, Schwegmann-Weßels C. Analysis of the palmitoylation of transmissible gastroenteritis coronavirus surface glycoprotein S. Biochemical Society, Regulation of protein trafficking and function by palmitoylation, Oxford (UK), 2012. (Präsentation durch K. Eschke und S. Siewert)

Siewert S, Schwegmann-Weßels C. Coronavirus S-M protein interaction: Does the cysteine-rich region in the S protein play a crucial role? EMBO meeting, Wien (Österreich), 2011.

Siewert S, Schwegmann-Weßels C. Role of the cytoplasmic tail of the TGEV Spike Protein for the Interaction with the TGEV Membrane Protein. Gesellschaft für Virologie, 21st Annual Meeting, Freiburg, 2011

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Christel Schwegmann-Weßels für die Überlassung dieses interessanten Themas meiner Arbeit. Ich danke ihr für die hervorragende Betreuung, die vielen fachlichen Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit und dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat meine eigenen Ideen zu verwirklichen.

Bei meinen Supervisoren Herrn Prof. Dr. Thomas Pietschmann und Herrn Prof. Dr. Hassan Y. Naim möchte ich mich für die konstruktiven Anregungen unserer Betreuungsgruppengespräche bedanken. Herrn Prof. Dr. Hassan Y. Naim möchte ich ebenfalls für die Möglichkeit danken, dass ich in dem Isotopenlabor seines Instituts arbeiten durfte und immer herzlich willkommen war.

Für die Einarbeitung im Isotopenlabor möche ich Lena Diekmann danken.

Bei Herrn Dr. Michael Veit möchte ich mich für den Aufenthalt in seiner Arbeitsgruppe bedanken, um die Palmitoylierungsversuche durchzuführen. Herrn Dr. Bastian Thaa danke ich dabei ganz besonders für die hervorragende Betreuung im Labor, der Wiederholungen der Experimente und für seine herzliche Art und Begeisterung für die Wissenschaft.

Dr. Stefanie Schmeißer und Frau Rohn danke ich für die Hilfe beim Anfertigen der Elektronenmikroskopaufnahmen.

Ich danke allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Virologie für die schöne Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft, Anne, Ann-Kathrin, Christine, Fandan, Holger, Jana, Markus, Martina H., Martina K., Moni, Nadine, Nai-Hui, Sabine, Sandra, Tanja, Tim, Trust, Wei und insbesondere meinen Zimmernachbarn im „Saustall“, Anna R., Karim, Anna T. und Katarina.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung, denn ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen.